

repository.ub.ac.id

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL DAUN KEMANGI  
(*Ocimum canum* Sims.) TERHADAP GAMBARAN PROFIL  
PROTEIN DAN EKSPRESI TRYPTASE  
PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*)  
MODEL ASMA**

**SKRIPSI**

Oleh:

**DEVI INTAN DYAH AYU OCTAVIANI  
135130101111013**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2018**



**LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI**

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL DAUNKEMANGI (*Ocimum  
canum* Sims.) TERHADAP EKSPRESI TRYPTASE DAN GAMBARAN  
PROFIL PROTEIN PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*)  
MODEL ASMA**

Oleh:

**Devi Intan Dyah Ayu Octaviani  
NIM. 135130101111013**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji  
pada tanggal 07 Agustus 2018  
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh  
gelar Sarjana Kedokteran Hewan

Dosen Pembimbing I

Dosen Pembimbing II



Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES  
NIP. 19600903 198802 2 001

Wibi Riawan, S.Si., M. Biomed  
NIP. 1977013 1200501 1 001

Mengetahui,  
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Brawijaya



Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES  
NIP. 19600903 198802 2 001



**LEMBAR PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Devi Intan Dyah Ayu Octaviani

NIM : 135130101111013

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul:

**Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Kemangi (*Ocimum canum* Sims.) Terhadap Gambaran Profil Protein dan Ekspresi Tryptase pada tikus (*Rattus norvegicus*) Model Asma**

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaksud di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 07 Agustus 2018

Yang menyatakan,

(Devi Intan Dyah Ayu Octaviani)

NIM. 13513010111101

## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa atas berkat dan anugerah-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL DAUN KEMANGI (*Ocimum canum* Sims.) TERHADAP GAMBARAN PROFIL PROTEIN DAN EKSPRESI TRYPTASE PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*) MODEL ASMA**”.

Penyusun menyampaikan terima kasih sebesar-besarnya kepada seluruh pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan proposal skripsi ini, secara khusus penyusun menyampaikan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES yang telah menyempatkan dan menyisihkan waktunya untuk membimbing penulis pada saat penulisan skripsi ini.
2. Wibi Riawan, S.Si., M.Biomed yang telah menyempatkan dan menyisihkan waktunya untuk membimbing penulis pada saat penulisan skripsi ini.
3. Drh. Fidi Nur Aini EPD, M.S selaku dosen penguji skripsi atas segala kritik, saran dan bimbingan dalam penulisan skripsi ini.
4. drh. Ahmad Fauzi, M.Sc. selaku dosen penguji skripsi atas segala kritik, saran dan bimbingan dalam penulisan skripsi ini.
5. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
6. Orang tua tercinta yang selalu memberikan motivasi, saran dan semangat kepada penulis
7. Seluruh dosen yang telah membimbing dan memberikan ilmu selama menjalankan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya
8. Keluarga besar TIVA (A - 2013) dan seluruh kolega di FKH UB.
9. Seluruh staff karyawan bagian akademik dan kemahasiswaan yang selalu memberikan keceriaan
10. Dan semua pihak yang turut membantu dalam penyusunan skripsi ini yang tidak mungkin kami sebutkan satu persatu.

Penulis sadar bahwa skripsi ini jauh dari sempurna. Penulis berharap proposal skripsi ini dapat bermanfaat khususnya bagi penulis dan umumnya bagi pembaca untuk itu saran yang membangun sangat penulis harapkan.

Malang, 07 Agustus 2018

Penulis



**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL DAUN KEMANGI (*Ocimum canum* Sims.) TERHADAP GAMBARAN PROFIL PROTEIN DAN EKSPRESI TRYPTASE PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*) MODEL ASMA**

**ABSTRAK**

Asma merupakan inflamasi kronik saluran napas dengan tanda utama berupa obstruksi saluran napas reversibel akibat kontraksi otot polos bronkus, hipersekresi mukus, dan edema mukosa. Pemberian ovalbumin (OVA) dapat menyebabkan asma dan diperparah dengan lipopolisakarida (LPS). Pemberian ekstrak daun kemangi (*Ocimum canum* Sims.) digunakan sebagai terapi penyakit asma karena memiliki kandungan antioksidan dan antiinflamasi sehingga dapat digunakan untuk terapi alternatif asma. Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui pengaruh terapi ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum canum* Sims.) terhadap ekspresi Tryptase dan gambaran profil protein organ paru tikus putih model asma. Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan lima kelompok tikus, yaitu kelompok kontrol negatif, kontrol positif yang diinduksi OVA dan LPS dan kelompok P1, P2, P3 adalah tikus model asma yang berturut – turut mendapat terapi ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum canum* Sims.) dengan dosis 600 mg/kg BB, 900 mg/kg BB dan 1200 mg/kg BB. Parameter yang diamati adalah ekspresi Tryptase yang diamati dengan imunohistokimia dan profil protein yang diamati dengan metode SDS-PAGE. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian terapi ekstrak daun kemangi (*Ocimum canum* Sims.) secara signifikan ( $P < 0,05$ ) menurunkan ekspresi *tryptase* dan memperbaiki profil pita protein. Dosis 1200 mg/kgBB merupakan dosis terbaik. Kesimpulan, ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum canum* Sims.) dapat dijadikan salah satu alternatif pengobatan asma.

**Kata Kunci:** *Ocimum canum* Sims., Asma, Ekspresi Tryptase, profil protein.

repository.ub.ac.id

**THE THERAPY EFFECT OF *Ocimum canum* Sims ETANOL EXTRACT  
TOWARDS THE PROTEIN PROFILE AND TRYPTASE  
EXPRESSION ON ASTHMA  
RATS (*Rattus norvegicus*)**

**ABSTRACT**

Asthma is chronic inflammation on respiratory tract that signed with the obstruction on reversible respiratory tract due to the contraction of bronchial muscle, hyper secretion of mucus, and edema mucosa. The adding of ovalbumin (OVA) caused asthma and aggravated with the adding of lipopolysaccharide (LPS). The adding of *Ocimum canum* Sims. was used as therapy for asthma due to its content of antioxidant and anti inflammation, this extract could be used as alternative therapy for asthma. This study aimed to understand the effect of therapy by using etanol extract of *Ocimum canum* Sims. against the Tryptase expression and the protein profile on rat's lungs which the asthma model. This study was conducted by using five groups of white rat, they were the group of negative control, positive control that inducted with OVA and LPS and the group of P1, P2, and P3 were the same rat model that got the same therapy of etanol extract of *Ocimum canum* Sims. with doses of 600 mg/kg BW, 900 mg/kg BW, and 1200 mg/kg BW. The observed parameters were Tryptase expression that observed by using immunohistochemistry technique and profile protein that observed by using SDS-PAGE methods. The result of study showed that therapy by using etanol extract of *Ocimum canum* Sims. decreased significantly the tryptase expression ( $P < 0.05$ ) and repaired the profile protein and therapy at the doses of 1200 mg/kg BW was the best doses. In conclusion etanol extract of *Ocimum canum* Sims. could be one of alternative therapy for asthma.

**Keywords:** *Ocimum canum* Sims, Asthma, Tryptase expression, Protein profile

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>i</b>
<b>LEMBAR PENGESAHAN .....</b>	<b>ii</b>
<b>LEMBAR PERNYATAAN .....</b>	<b>iii</b>
<b>ABSTRAK .....</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>v</b>
<b>KATA PENGANTAR.....</b>	<b>vi</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>viii</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>x</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>xi</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>xii</b>
<b>DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG .....</b>	<b>xiii</b>
<b>BAB I. PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Batasan Masalah .....	4
1.4 Tujuan Penelitian .....	5
1.5 Manfaat Penelitian.....	6
<b>BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>7</b>
2.1 Asma.....	7
2.1.1 Etiologi.....	7
2.1.2 Gejala Klinis.....	8
2.1.3 Diagnosa.....	8
2.1.4 Patomekanisme.....	9
2.2 Histopatologi Bronkus pada Asma .....	11
2.3 Hewan Coba Tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ) Model Asma .....	13
2.3.1 Induksi Ovalbumin.....	14
2.3.2 Induksi Lipopolisakarida.....	15
2.4 Enzim Tryptase.....	17
2.5 Kemangi ( <i>Ocimum canum</i> Sims.).....	18
2.5.1 Morfologi .....	20
2.5.2 Kandungan .....	21
2.5.3 Manfaat.....	21
<b>BAB III. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESA PENELITIAN.....</b>	<b>23</b>

3.1	Kerangka Konsep.....	23
3.2	Hipotesa Penelitian .....	26
<b>BAB IV. METODOLOGI PENELITIAN .....</b>		<b>27</b>
4.1	Waktu dan Tempat Penelitian.....	27
4.2	Alat dan Bahan Penelitian .....	27
4.2.1	Alat Penelitian .....	27
4.2.2	Bahan Penelitian.....	27
4.3	Tahapan Penelitian.....	28
4.3.1	Sampel Penelitian .....	28
4.3.2	Rancangan Penelitian .....	28
4.3.3	Variabel Penelitian .....	30
4.4	Prosedur Kerja .....	30
4.4.1	Persiapan Hewan Coba.....	30
4.4.2	Perlakuan Hewan Model Asma.....	30
4.4.3	Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Kemangi .....	31
4.4.4	Pemberian Terapi Ekstrak Etanol Daun Kemangi .....	32
4.4.5	Koleksi Organ Paru-paru (Bronkus) .....	32
4.4.6	Pembuatan Preparat Histopatologi .....	33
4.4.7	Pengukuran Ekspresi Tryptase Metode IHK.....	34
4.4.8	Pengamatan Pita Profi Protein.....	35
4.5	Analisa Data.....	39
<b>BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>		<b>40</b>
5.1	Pengaruh Terapi Ekstrak Daun Kemangi ( <i>Ocimum canum</i> Sims.) terhadap Profil Protein Organ Paru-Paru Tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ) Model Asma .....	40
5.2	Pemberian Ekstrak Kemangi ( <i>Ocimum canum</i> Sims.) terhadap Ekspresi <i>Tryptase</i> pada Tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ) Model Asma.....	45
<b>BAB VI. PENUTUP .....</b>		<b>51</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>		<b>52</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>		<b>58</b>

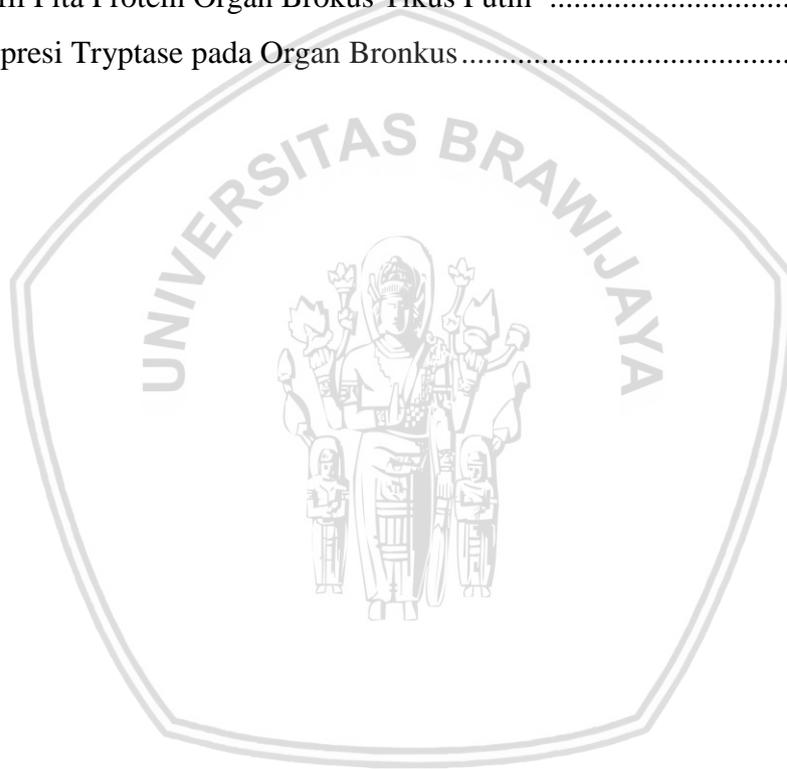
## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
3.1 Rancangan penelitian dengan 5 Kelompok Perlakuan.....	29
5.1 Perbedaan Berat molekul Profil Pita Protein .....	41
5.2 Ekspresi tryptase pada tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ) model asma .....	47



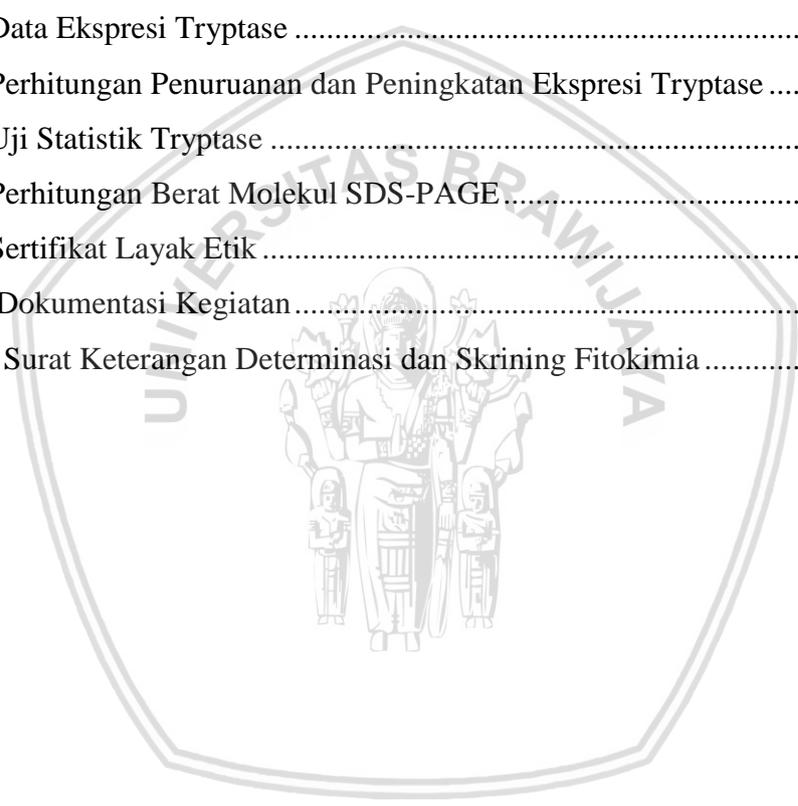
**DAFTAR GAMBAR**

<b>Gambar</b>	<b>Halaman</b>
2.1 Perbandingan Histologi Bronkus Normal dan Asma.....	12
2.2 Struktur Dinding Bakteri Gram Negatif.....	16
2.3 Kemangi ( <i>Ocimum canum</i> Sims.).....	20
3.1 Kerangka Konseptual .....	23
5.1 Profil Pita Protein Organ Brokus Tikus Putih .....	41
5.2 Ekspresi Tryptase pada Organ Bronkus.....	46



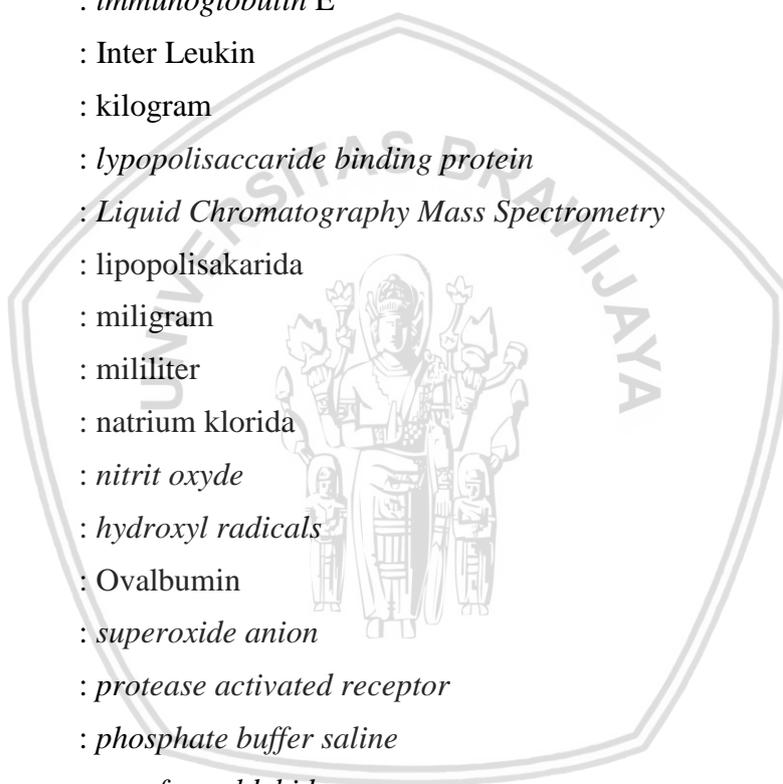
**DAFTAR LAMPIRAN**

<b>Lampiran</b>	<b>Halaman</b>
1 Komposisi Pakan Standar AIN-93 .....	58
2 Perhitungan Dosis .....	59
3 Kerangka Operasional.....	62
4 Skema Kerja.....	63
5 Data Ekspresi Tryptase .....	66
6 Perhitungan Penurunan dan Peningkatan Ekspresi Tryptase .....	67
7 Uji Statistik Tryptase .....	69
8 Perhitungan Berat Molekul SDS-PAGE.....	71
9 Sertifikat Layak Etik .....	74
10 Dokumentasi Kegiatan.....	75
11 Surat Keterangan Determinasi dan Skrining Fitokimia .....	77



**DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG**

AlOH <sub>3</sub>	: <i>aluminium hydroxide</i>
ANOVA	: <i>Analisis of Varian</i>
APC	: <i>Antigen Presenting Cell</i>
BB	: Berat badan
BNJ	: Beda Nyata Jujur
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: <i>hydrogen peroxide</i>
IgE	: <i>immunoglobulin E</i>
IL	: Inter Leukin
Kg	: kilogram
LBP	: <i>lipopolisaccaride binding protein</i>
LCMS	: <i>Liquid Chromatography Mass Spectrometry</i>
LPS	: lipopolisakarida
mg	: miligram
mL	: mililiter
NaCl	: natrium klorida
NO	: <i>nitrit oxyde</i>
OH	: <i>hydroxyl radicals</i>
OVA	: Ovalbumin
O <sub>2</sub>	: <i>superoxide anion</i>
PAR	: <i>protease activated receptor</i>
PBS	: <i>phosphate buffer saline</i>
PFA	: <i>paraformaldehyd</i>
ppm	: part per million
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
RAL	: rancangan acak lengkap
Rpm	: rotation per minute
TCA	: trichloacetic acid
Th2	: T helper 2
WHO	: World Health Organization
μL	: microliter



## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Asma merupakan inflamasi kronik saluran napas dengan tanda utama berupa obstruksi saluran napas reversibel akibat kontraksi otot polos bronkus, hipersekresi mukus, dan edema mukosa (Leveno, 2009). Inflamasi saluran pernapasan pada asma merupakan proses yang sangat kompleks, melibatkan faktor genetik, antigen, berbagai sel inflamasi, interaksi antar sel seperti sel mast yang mensekresi tryptase dan mediator yang membentuk proses inflamasi kronik dan remodeling jaringan (Sundaru, 2002). Gejala asma biasanya ditandai dengan episodik berulang berupa batuk, sesak nafas, wheezing (mengi) dan rasa berat di dada (Rengganis, 2008).

Asma sering ditemukan di negara maju maupun di negara berkembang (Matondang dkk., 2009). Menurut World Health Organization (WHO) terdapat sekitar 100-150 juta penduduk di dunia menderita asma dan diperkirakan jumlahnya terus bertambah sekitar 180.000 setiap tahunnya (Nugroho, 2006). Angka kematian sebesar 250.000 setiap tahun dan diperkirakan akan meningkatkan menjadi 400 juta orang pada tahun 2025 (Carol, 2011). Sedangkan di Indonesia penderita asma diperkirakan 2-7% dari total jumlah penduduk (Nugroho, 2006). Asma tidak hanya diderita oleh manusia tetapi juga dapat menyerang pada hewan (Bonagura, 2008). Menurut Carey (2011) prevalensi asma pada kucing sekitar 1-5% dari jumlah populasi seluruh dunia.

Prevalensi asma yang tinggi pada kucing terjadi karena adanya kombinasi penyebab antara faktor genetik dan paparan alergen dari lingkungan (Reinero, 2013). Ovalbumin merupakan 60-65% komponen dalam putih telur, dan terdiri atas 385 asam amino dengan massa molekul 45 kDa yang dapat digunakan sebagai alergen untuk paparan kronik dalam menimbulkan asma yang ditandai dengan perubahan struktur saluran nafas dan inflamasi (Huntington dan Stein, 2001; Barlianto dkk., 2009). Lipopolisakrida (LPS) dari bakteri Gram negatif *Phorphyromonas gingivalis* mampu meningkatkan tingkat keparahan asma (Utomo, 2012). Dari hasil pemeriksaan plak pada gigi anjing ditemukan bakteri *Phorphyromonas gingivalis* (68%), *Prevotella intermedia* (44%) dan *Actinomyces* (12%), sehingga LPS dari bakteri *Phorphyromonas gingivalis* paling sering digunakan untuk meningkatkan keparahan asma (David *et al.*, 2005).

Alergen yang masuk diendositosisis oleh APCs, terdeteksi oleh sel T lalu sel T berdiferensiasi menjadi sel Th2 kemudian menginduksi produksi IgE oleh sel B. IgE kemudian menempel pada reseptor nya di permukaan sel mast dan basofil (Ishmael, 2011). Akibat aktivasi oleh alergen ini maka dilepaskan mediator-mediator yang menginisiasi bronkospasme seperti tryptase dari sel mast dan mediator inflamasi sitokin lainnya (Ayu, 2016). Tryptase merupakan mediator yang dilepaskan oleh sel mast, kebanyakan dihasilkan diepitel paru-paru dibandingkan oleh sel mast yang tidak mengandung tryptase seperti sel mast kulit dan jaringan ikat (Bachelet, 2005).

Tingginya aktivitas protease netral yang disebut tryptase dapat menunjukkan keparahan kondisi asma (Reed dan Kita, 2004).

Pengobatan asma dapat dilakukan dengan menggunakan obat-obat bronkodilator seperti, salbutamol (albuterol), proterenol (orsiprenalin), terbutalin, fenoterol yang memiliki efek samping meliputi hipertensi dan osteoporosis (Gunawan dkk., 2007). Oleh karena itu dibutuhkan alternatif pengobatan asma dengan bahan alam.

Kemangi (*Ocimum canum* Sims.) memiliki kandungan kimia aktif di dalamnya, meliputi : flavonoid, karbohidrat, fitosterol, tanin, dan minyak atsiri (Sarma and Babu, 2011). Senyawa Flavonoid memiliki kegunaan sebagai antioksidan, anti proliferasi, anti tumor, anti mikroba, dan antiinflamasi (Dera, 2014). Flavonoid merupakan senyawa yang memiliki aktivitas farmakologi sebagai antiinflamasi. Flavonoid berpotensi menekan peradangan dengan menghambat aktivitas enzim siklooksigenase (COX) dan pelepasan histamin (Riansyah dkk., 2015).

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum canum* Sims.) terhadap ekspresi tryptase dan gambaran profil protein pada tikus (*Rattus norvegicus*) model asma yang diinduksi ovalbumin dan lipopolisakarida dalam upaya mengurangi peningkatan ekspresi tryptase dan perubahan gambaran profil protein pada tikus (*Rattus norvegicus*).

## 1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Apakah pemberian ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum canum* Sims.) menurunkan profil protein organ paru-paru tikus (*Rattus norvegicus*) model asma induksi ovalbumin, diperparah dengan lipopolisakarida?
2. Apakah pemberian ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum canum* Sims.) dapat mengurangi ekspresi tryptase sel mast pada jaringan bronkus tikus (*Rattus norvegicus*) model asma yang diinduksi ovalbumin dan lipopolisakarida?

## 1.3 Batasan Masalah

Beberapa batasan masalah pada penelitian ini adalah:

1. Hewan coba yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar umur 8-12 minggu dengan berat 150-200 gram yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Penggunaan tikus telah mendapat persetujuan dari Komisi Etik Penelitian UB.
2. Induksi asma dilakukan dengan pemberian ovalbumin sebanyak 3 kali secara interperitoneal 10 µg/mL pada hari ke-1 dan hari ke-14 serta secara inhalasi pada hari ke-21 menggunakan nebulizer 1mg/mL selama 20 menit. dan lipopolisakarida dari bakteri *Porphyromonas gingivalis* secara intramuskuler dilakukan dengan dosis 1 µg/mL pada sulkus gingiva molar rahang atas kiri tikus berturut-turut pada hari ke-10 dan ke-11 untuk meningkatkan derajat keparahan (Utomo, 2012).

3. Kemangi (*Ocimum canum* Sims.) yang dipakai adalah daun kemangi yang berasal dari kota Malang. Bagian daun kemangi yang dikeringkan dan selanjutnya di ekstraksi dengan menggunakan etanol 70% (Dera, 2014).
4. Terapi pemberian ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum canum* Sims.) diberikan pada hewan coba dimulai pada hari ke-22, tiap hewan coba diberikan terapi secara per oral dengan dosis pemberian sebesar 600 mg/kg BB, 900 mg/kg BB, dan 1200 mg/kg BB selama 14 hari.
5. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah ekspresi tryptase pada jaringan bronkus menggunakan metode Imunohistokimia dan gambaran profil protein pada gerusan paru-paru tikus menggunakan metode SDS-PAGE.

#### 1.4 Tujuan Penelitian

Berdasar latar belakang yang telah diuraikan, maka tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mengetahui pengaruh terapi ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum canum* Sims.) dapat menurunkan gambaran profil protein pada gerusan paru-paru tikus (*Rattus norvegicus*) model asma yang diinduksi ovalbumin dan lipopolisakarida.
2. Mengetahui pengaruh terapi ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum canum* Sims.) terhadap ekspresi tryptase pada jaringan bronkus tikus (*Rattus norvegicus*) model asma yang diinduksi ovalbumin dan lipopolisakarida.

### 1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat menjadi informasi dalam kajian ilmiah tentang manfaat dari ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum canum* Sims.) terhadap ekspresi tryptase dan gambaran profil protein pada tikus (*Rattus norvegicus*) model asma yang diinduksi ovalbumin dan lipopolisakarida.



## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Asma

Asma merupakan penyakit inflamasi kronis pada saluran pernapasan yang menyebabkan penyempitan saluran nafas (Nelson, 2007). Inflamasi kronis pada saluran pernafasan melibatkan berbagai sel seperti sel mast yang menghasilkan tryptase dan mediator, sehingga terjadi peningkatan kepekaan saluran pernafasan (Barnes *et al.*, 2003). Prevalensi asma di dunia berdasarkan catatan Global Initiative for Asthma, jumlah penderita asma di seluruh dunia berjumlah sekitar 300 juta orang dengan angka kematian sebesar 250.000 setiap tahun dan diperkirakan akan meningkatkan menjadi 400 juta orang pada tahun 2025 (Carol, 2011). Di Indonesia diperkirakan 2-7% dari total jumlah penduduk penderita asma (Nugroho, 2006). Kejadian asma pada hewan banyak dijumpai pada kucing dan anjing dan dapat menyerang anjing dan kucing di segala usia, prevalensi asma pada kucing sekitar 1-5% dari jumlah populasi seluruh dunia (Carey, 2011).

#### 2.1.1 Etiologi

Inflamasi saluran pernapasan pada asma merupakan proses yang sangat kompleks, melibatkan faktor genetik, antigen, berbagai sel inflamasi, interaksi antar sel dan mediator yang membentuk proses inflamasi kronik dan remodeling (Sundaru, 2002). Serangan Asma dapat diebabkan oleh beberapa faktor antara lain virus, alergen, dan iritan yang menginduksi respon inflamasi (Sari, 2013). Alergen yang umum digunakan dalam pembuatan hewan model asma menimbulkan respon

inflamasi pada saluran pernapasan adalah Ovalbumin (OVA) dan Lipopolisakarida (Utomo, 2012).

Asma pada hewan dipengaruhi oleh banyak faktor, salah satunya adalah infeksi rongga mulut yang telah diketahui mampu menyebabkan keadaan asma pada anjing dan polusi udara yang mampu menyebabkan gangguan pernafasan pada kucing (Foster *et al.*, 2004).

### **2.1.2 Gejala Klinis**

Asma mendasari gangguan obstruksi saluran pernafasan dengan gejala khas asma berupa batuk, rasa berat di dada, dan sesak. Hiperresponsif saluran pernafasan akan merangsang terjadinya bronkokonstriksi. Lapisan otot polos pada saluran pernafasan juga menjadi lebih tebal pada penderita asma akibat hasil peningkatan jumlah sel otot polos (hiperplasia) dan peningkatan ukurannya (hipertrofi). Hipertrofi dan hiperplasia otot polos saluran pernafasan, sel goblet dan kelenjar saluran pernafasan, serta hipersekresi kelenjar mukus menyebabkan penyempitan saluran napas (Barnes *et al.*, 2003) Hewan yang menderita asma memiliki gejala klinis batuk dan sesak nafas (Foster *et al.*, 2004).

### **2.1.3 Diagnosa**

Asma ditandai dengan obstruksi saluran pernafasan, hiperesponsivitas, hipersekresi mukus, edema dinding saluran pernafasan, deskuamasi epitel, infiltrasi sel inflamasi serta remodeling dari saluran pernafasan. Proses inflamasi asma khas ditandai dengan peningkatan eosinofil, sel mast, makrofag serta limfosit-T di lumen dan mukosa saluran pernafasan (Busse dan Lemanske, 2001).

Tryptase merupakan mediator yang dilepaskan oleh sel mast, Tingginya aktivitas protease netral yang disebut tryptase dapat dijadikan sebagai marker untuk menentukan derajat keparahan kondisi asma (Reed dan Kita, 2004).

#### **2.1.4 Patomekanisme**

Mekanisme terjadinya asma terbagi menjadi beberapa tahapan, berikut ini adalah fase yang khas terjadi pada asma bila terpapar oleh suatu alergen.

##### **1. Fase Induksi**

Proses inflamasi pada saluran pernafasan dimulai dari masuknya alergen ke dalam saluran pernafasan. Sebagian besar antigen akan dibersihkan oleh pergerakan mukosiliar. Alergen yang dapat melalui mekanisme pertahanan tersebut akan ditangkap oleh antigen presenting cell (APC) terutama sel dendritik dan makrofag alveolar. Alergen tersebut akan dibawa ke kelenjar limfe dan dipresentasikan ke sel T dan sel B. Sel Th yang teraktivasi akan menghasilkan berbagai sitokin seperti interleukin (IL)-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-18, interferon (IFN)- $\gamma$ , tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , dan granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF). Sitokin yang paling berperan dalam perkembangan asma adalah IL-4, IL-5, IL-9, dan IL-13. IL-4 dan IL-13 berperan penting pada produksi IgE. Interleukin-4 dan 13 bersama dengan IL-9 berperan dalam menghasilkan sel mast, produksi mukus yang berlebih dan hiperresponsivitas jalan napas.

Sitokin utama yang menyebabkan akumulasi eosinofil adalah IL-5 (Verstraelen *et al.*, 2008).

## 2. Reaksi Asma Fase Dini

Sel mast berperan penting pada reaksi asma fase dini yang menghubungkan IgE dan saluran pernafasan. Hiperresponsif ditemukan di jaringan penunjang bronkus dan ruang perifer intraalveolar dengan melepaskan zat kimia dan jumlah sel mast akan meningkat setelah paparan alergen. Sel mast terlokalisir di dalam sel otot polos bronkus dan epitel bronkus penderita asma dan akan menginfiltrasi kelenjar mukus saluran pernafasan. Sel mast sendiri dihasilkan dari sel induk pluripoten CD34+ dan bersirkulasi di dalam darah kemudian akan kembali ke jaringan. Saat terjadi serangan asma, jumlah sel mast yang berdegranulasi meningkat (Spertini *et al.*, 2009).

## 3. Reaksi Asma Fase Lanjutan

Reaksi asma fase dini yang berlangsung sekitar 4-6 jam berikutnya akan diikuti reaksi asma fase lanjut yang lebih berat dan lama. Secara umum sel mast dan mediator-mediator yang dilepaskannya akan menginduksi terjadinya kontriksi jalan napas, meningkatnya permeabilitas vaskular, hiperresponsif jalan napas, sekresi mukus, dan meningkatkan penarikan sel-sel inflamasi ke dalam saluran pernafasan setelah beberapa jam paparan alergen terutama eosinofil selain itu sel T, makrofag, basofil, neutrofil, serta sel-sel struktural seperti epitel, fibroblas, sel endotel, dan sel-sel otot polos (Verstraelen *et al.*, 2008).

Sel-sel inflamasi ini dapat menghasilkan mediator-mediator inflamasi yang sangat banyak seperti kemokin, sitokin, dan leukotrien yang berpengaruh baik secara langsung terhadap saluran pernafasan maupun secara tidak langsung melalui mekanisme neural, peningkatan inflamasi saluran pernafasan kronik setelah paparan alergen berulang. Hasilnya yaitu reaksi inflamasi kronik di saluran pernafasan yang terus-menerus mengalami cedera hingga menimbulkan perubahan struktural saluran pernafasan. Perubahan struktur ini secara keseluruhan disebut sebagai proses remodeling saluran pernafasan (Canonica, 2006).

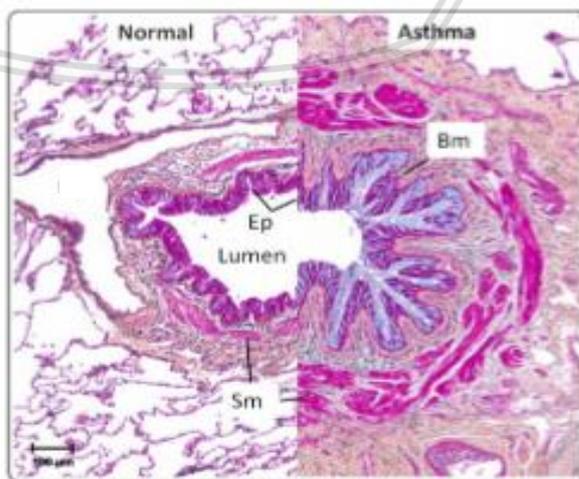
## **2.2 Histopatologi Bronkus pada Asma**

Bronkus merupakan bagian dari paru-paru yang terletak di dalam rongga dada bagian atas, di bagian samping dibatasi oleh otot dan rusuk dan di bagian bawah dibatasi oleh diafragma yang berotot kuat (Arobi, 2010). Bronkus merupakan saluran berbentuk pipa yang merupakan percabangan dari trakea dan berakhir di alveoli (Hernawati, 2005).

Asma mempengaruhi saluran pernapasan sentral dan periferall seperti perubahan seluler akibat infiltrasi sel inflamatori dan perubahan struktural dinding saluran pernapasan sebagai respon untuk memperbaiki jaringan yang rusak akibat inflamasi (Jeffery, 2004). Struktur epitel bronkus secara normal terdiri dari epitel silindris pseudostratified bersilia yang melapisi lumen bronkus. Epitel tersebut melekat pada membran basal. Terdapat kolagen, fibroblas, dan matriks ekstraseluler di bawah membran basal. Otot polos, pembuluh darah, dan saraf berada setelah

lapisan matriks ekstraseluler (Wadsworth, *et al.*, 2012). Pada asma terjadi mekanisme inflamasi, kerusakan sel epitel, dan hiperresponsif bronkus. Hiperresponsif bronkus dan kerusakan epitel merupakan respon yang berlebihan akibat paparan alergen. Epitel merupakan barrier pertama yang berinteraksi secara langsung terhadap paparan alergen. Paparan ovalbumin dan LPS pada tikus asma akan membuat struktur epitel bronkus menjadi rusak dan lepas dari membran basal sehingga terjadi proses remodeling saluran pernapasan (Utomo, 2012).

Perubahan pada *remodeling* tersebut tidak menunjukkan adanya perbaikan secara klinis, namun lumen bronkus menyempit dan memberikan gambaran klinis asma kronis pada **Gambar 2.1**. Akibat proses remodeling tersebut terjadi hiperplasia sel goblet pada epitel sehingga produksi mukus yang berlebihan, terjadi penebalan membran basal, dan penebalan otot polos (Wadsworth, *et al.*, 2012).



**Gambar 2.1** Perbandingan histologi bronkus normal dan Asma, (Ep) Epitel (Bm) Membran basal (Sm) Otot polos (Wadsworth, *et al.*, 2012).

## 2.3 Hewan Coba Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Asma

Hewan coba adalah hewan yang dapat digunakan untuk tujuan suatu penelitian. Pemakaian hewan coba dilakukan dalam berbagai penelitian biomedikal seperti penelitian toksikologi, mikrobiologi, imunologi, pengembangan obat-obatan dan vaksin (Ridwan, 2013). Tikus *Rattus norvegicus* merupakan hewan yang umum digunakan dalam penelitian, karena mudah dipelihara, secara garis besar fungsi dan bentuk organ serta proses biokimia antara tikus dan manusia memiliki banyak kesamaan (Suckow *et al.*, 2006). Klasifikasi tikus yang digunakan dalam penelitian menurut Armitage (2004), adalah sebagai berikut:

Kingdom : Animalia  
Kelas : Mamalia  
Ordo : Rodentia  
Famili : Muridae  
Genus : *Rattus*  
Spesies : *Rattus norvegicus*

Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) memiliki waktu hidup 2,5-3,5 tahun, berat badan jantan 300-500 gram dan betina 250-300 gram, denyut jantung 330-480 kali per menit, frekuensi respirasi 85 kali per menit dan memasuki masa dewasa pada usia 40-60 hari.

### 2.3.1 Induksi Ovalbumin

Ovalbumin yang berasal dari telur merupakan alergen kuat yang sering digunakan untuk menginduksi radang pada saluran pernapasan

hewan coba (Nials and Udin, 2008). Ovalbumin merupakan 60-65% komponen dalam putih telur, dan terdiri atas 385 asam amino dengan massa molekul 45 kDa (Huntingeston dan Stein, 2001). Paparan kronik ovalbumin sebagai alergen akan menimbulkan perubahan struktur saluran nafas dan inflamasi (Barlianto dkk., 2009). Pemberian ovalbumin memberikan gambaran peningkatan IgE dan terjadi inflamasi (Tang dkk., 2006).

Ovalbumin (Ova) akan masuk yang pertama akan mengalami proses sensitisasi ditangkap oleh makrofag atau dendrit sel sebagai *Antigen Presenting Cell* (APC). Alergen yang telah tertangkap kemudian dibawa masuk melalui sistem limfatik untuk dipresentasikan kepada sel T yang akan memicu produksi sitokin pro inflamasi yang akan menyetimulasi sel B untuk memproduksi IgG (Antibodi protective yang normal dan tidak dihasilkan pada reaksi alergi). Jika terjadi proses pemaparan ovalbumin ulang maka sel B berkembang menjadi sel plasma yang membentuk IgE (imunoglobulin yang bekerja spesifik terhadap reaksi alergi) yang dilepas dan diikat oleh FcεR1 pada sel mast dan basofil sehingga akan menimbulkan pelepasan mediator seperti tryptase yang kebanyakan terdapat di epitel paru, yang akan mengawali reaksi awal asma yang dikarakterisasi dengan hipersekresi mukus, perubahan struktur saluran dan merangsang kontraksi otot polos sehingga menimbulkan penyempitan saluran nafas (Barnes *et al.*, 2003; Bachelet, 2005).

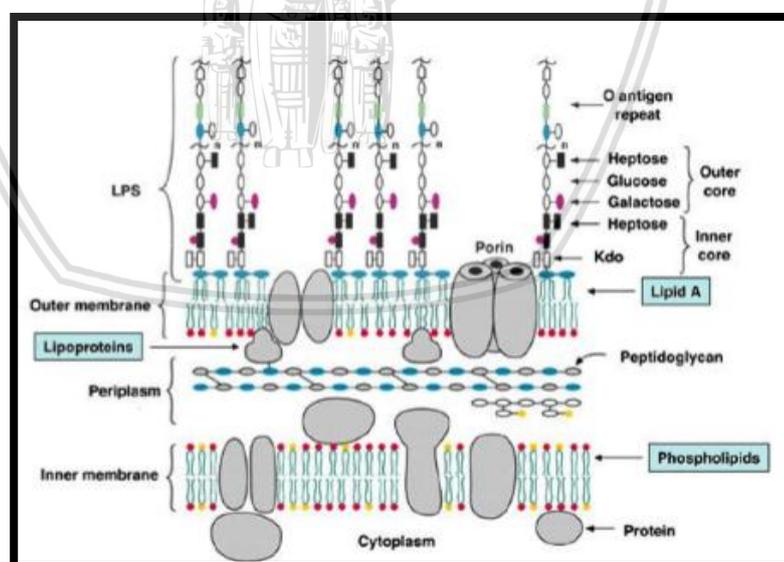
Sensitisasi alergi akut menggunakan alergen disertai dengan adjuvan alumunium hydroxide ( $Al(OH)_3$ ) yang dapat membantu pembentukan fenotip T helper 2 (Th2) ketika terpapar antigen. Setelah itu hewan coba dipapar dengan Ovalbumin melalui inhalasi menggunakan nebulizer, yang menyebabkan terjadinya keadaan inflamasi kronis. Keadaan tersebut digunakan untuk mengetahui gejala asma lanjut seperti remodeling saluran pernapasan dan hiperresponsivitas asma yang persisten, serta untuk menemukan model terapi baru atau mengevaluasi efek obat terhadap inflamasi paru (Nials and Udin, 2008).

### 2.3.2 Induksi Lipopolisakarida

Lipopolisakarida (LPS) merupakan faktor patogenik utama pada bakteri Gram negatif (Madigan *et al.*, 2003). Lipopolisakarida (LPS) merupakan dinding sel bakteri Gram negatif *Porphyromonas gingivalis* yang dapat menyebabkan infeksi rongga mulut. Berdasarkan penelitian Utomo (2012), paparan LPS pada tikus asma mampu memperparah kejadian asma yang mampu menimbulkan terjadinya inflamasi pada saluran pernafasan. Kondisi keparahan asma dapat dipengaruhi oleh infeksi yang terjadi pada daerah lain melalui mekanisme neurogenik, seperti infeksi pada rongga mulut. Sebuah literatur mengatakan bahwa terapi alternatif untuk mengurangi gejala asma adalah melalui kebersihan rongga mulut (Smits, 2009).

Lipopolisakarida (LPS) pada **Gambar 2.2** yang tersusun atas lipid bilayer, polisakarida, dan protein (Madigan *et al.*, 2003). Lipopolisakarida

terdiri atas tiga bagian, yaitu lipid A, polisakarida inti dan Polisakarida O. Lipid A adalah komponen hidrofobik yang terletak bagian luar *outer membrane protein* (OMP) dan berperan dalam toksisitas bakteri (Wang and Quinn, 2010). Sifat antigenik bakteri Gram negatif ditentukan oleh lipopolisakarida terutama polisakarida A. Lipid A menyebabkan bakteri lebih tahan terhadap fagositosis (Iman, dkk 2011). Polisakarida-O atau antigen-O adalah polisakarida kompleks yang disusun oleh 5-8 monosakarida. Polisakarida ini memiliki peranan penting dalam sifat antigenik, diantaranya adalah petahanan terhadap fagositosis sebuah bakteri, sebagai reseptor bakteriofag, dan modulasi aktivasi *alternative complement pathway*, serta untuk menghambat penempelan kompleks membran dengan *outer membrane* bakteri (Feulner, 2003).



Gambar 2.2 Struktur dinding bakteri gram negatif (Feulner, 2003).

## 2.4 Enzim Tryptase

Sel mast menghasilkan mediator yang disimpan dalam granul yang dikenal sebagai pre-formed mediator meliputi histamin, heparin, kondroitin sulfat E, Chymase, Tryptase, carboxypeptidase, cathepsin G dan activator plasminogen jaringan. Sedangkan mediator yang baru terbentuk atau dikenal dengan istilah newly synthesized mediators adalah leukotriene C4 (LTC4), leukotriene B4 (LTB4), prostaglandin D2 (PGD2), prostaglandin E2 (PGE2), platelet activating factor dan thromboxanes. Tryptase adalah merupakan protein yang terkonsentrasi selektif pada granules sekretori dari sel mast (Syamsul, 2010). Presentase triptase sekitar 25 % dari berat sel mast, terdapat dalam bentuk aktif melalui ikatan yang kuat dengan heparin. Identifikasi sel mast di dalam jaringan dapat dilakukan dengan cara melokalisir enzim triptase secara imunologi (Lee, 2007). Tryptase terdiri dari alfa-tryptase yang muncul pada sekresi konstitutif dan beta-tryptase tersimpan dalam granule sekretori sel mast, pelepasannya lebih spesifik untuk aktivasi dari pada alfa-tryptase (Rifa', 2004). Tryptase aktif yang berbentuk oligomers persubunitnya memiliki berat molekul antara 30-40 kDa. Pada manusia, tikus dan anjing berat molekul dari tryptase antara 110-150 kDa dengan berbentuk tetramer, sedangkan pada jaringan sapi dan marmut persubunit yang berbentuk multimeric complex dengan berat molekul berturut-turut 360 kDa dan 860 kDa (Bachelet, 2005).

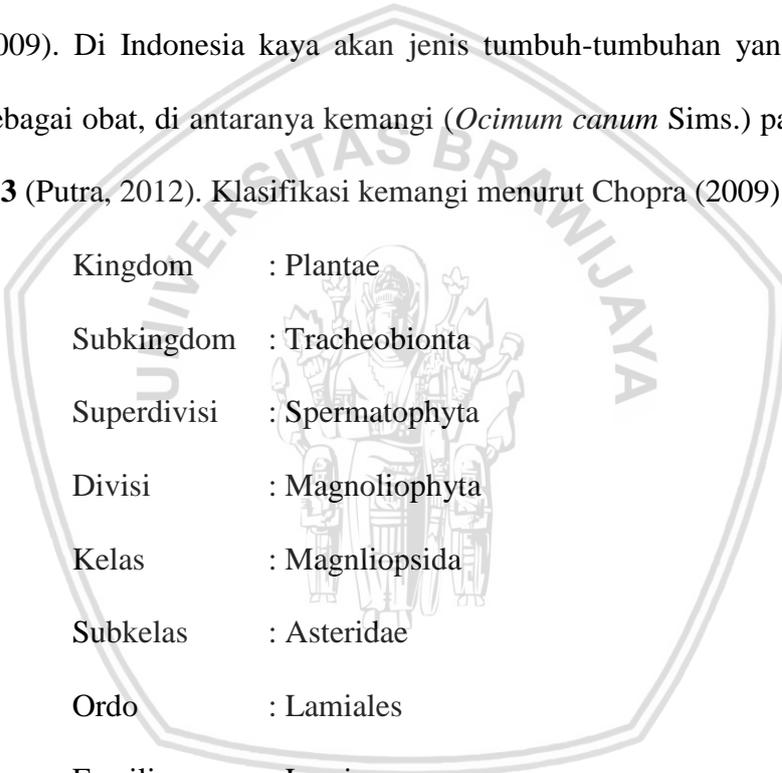
Tryptase kebanyakan dihasilkan diepitel paru-paru dibandingkan oleh sel mast yang tidak mengandung tryptase seperti sel mast kulit dan jaringan ikat (Bachelet, 2005). Peningkatan ekspresi tryptase dapat dipakai sebagai indikator untuk menunjukkan adanya aktivasi sel mast dan derajat keparahan klinis dari asma (Lee, 2007).

Tryptase akan mengaktifkan enzim metalloproteinase yang berada pada matrik ekstraselluler. Aktivitas enzim metalloproteinase itu pada akhirnya menyebabkan hancurnya matrik jaringan sehingga terjadi kerusakan pada jaringan (Rifa', 2004). Proses tersebut merupakan peranan sel mast pada homeostasis jaringan (Lee, 2007). Menurut Syamsul (2010) tryptase juga memiliki peran penting dalam peradangan dan berfungsi sebagai penanda aktivasi sel mast. Mekanisme dari degranulasi sel mast itu pada permukaannya akan terekspos oleh suatu spesifik antigen (alergen). Kemudian alergen akan berikatan dengan IgE pada permukaan sel mast, terjadilah *cross link* pada IgE antibodi dan IgE Fc *receptor*, Sehingga akan mengaktifkan suatu sinyal untuk *transduction pathway* yaitu berupa pengaktifan dari *adenyl cyclase*, yang akan berujung pada *phosphorylation* spesifik protein dan akan terjadi pembukaan katup  $Ca^{2+}$  pada endoplasmic reticulum,  $Ca^{2+}$  influx pada sel mast, mediator yang terdapat dalam granul akan keluar dan mulai memediasi secara lokal (Halim, 2016).

## 2.5 Kemangi (*Ocimum canum* Sims.)

Bangsa Indonesia telah lama mengenal dan menggunakan tanaman berkhasiat obat sebagai salah satu upaya dalam menanggulangi masalah

kesehatan (Fitri, 2014). Obat-obatan herbal cenderung lebih aman karena tidak memberikan efek samping yang terlalu besar bagi tubuh, sehingga obat-obatan herbal cenderung lebih murah harganya dibanding obat paten. Oleh karena itu, tidak mengherankan bila obat-obatan herbal kembali bangkit di kalangan masyarakat Indonesia (Mardiana, 2012). Oleh karena itu, diperlukan pengembangan alternatif dari tanaman obat (Joshi *et al.*, 2009). Di Indonesia kaya akan jenis tumbuh-tumbuhan yang digunakan sebagai obat, di antaranya kemangi (*Ocimum canum* Sims.) pada **Gambar 2.3** (Putra, 2012). Klasifikasi kemangi menurut Chopra (2009) yaitu :



Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Superdivisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnliopsida
Subkelas	: Asteridae
Ordo	: Lamiales
Famili	: Lamiaceae
Genus	: Ocimum
Spesies	: <i>Ocimum canum</i> Sims.



**Gambar 2.3** Kemangi (*Ocimum canum* Sims.)  
(Kembangraps, 2011)

### 2.5.1 Morfologi

Kemangi dapat dibedakan berdasarkan warna dan bentuk batang, daun, biji tanaman ini memiliki tinggi 0,3–0,6 meter, batang umumnya berwarna hijau keunguan, memiliki wangi yang sangat harum. Tangkai daun panjangnya 0,5-2 cm, bunga dapat tunggal dan majemuk. Daun pelindung berbentuk bulat dengan panjang 0,5-1 cm dengan sisi keluar berambut (Hadipoentyanti dan Wahyuni, 2008).

Setiap helaian daun berbentuk bulat telur sampai elips, memanjang dan ujung runcing atau tumpul. Pangkal daun pasak sampai membulat, dikedua permukaan berambut halus, tepi daun bergerigi lemah, bergelombang atau rata. Panjang kelopak buah 6-9 mm. Biji berukuran kecil, bertipe keras, coklat tua, dan waktu diambil segera membengkak,

tipe buah terdiri dari empat biji. Akar tunggang dan berwarna putih kotor (Tallamma, 2014).

### **2.5.2 Kandungan**

Kandungan kimia aktif di dalamnya, meliputi : antioksidan berupa flavonoid, karbohidrat, fitosterol, tanin, dan minyak atsiri (Sarma and Babu, 2011). Disamping itu juga mengandung flavon apigenin, luteolin, flavon O-glukotisidaapigenin 7-O glukoronida, luteolin 7-O glukoronida, flavon C-glukosida orientin, molludistin dan asam ursolat (Savira, 2012). Senyawa Flavon memiliki merupakan antioksidan (Berlian, 2016).

### **2.5.3 Manfaat**

Kemangi memiliki berbagai manfaat yaitu : sebagai analgesik, antibakteri, anti katarak, anti hiperlipidemi, anti inflamasi, antioksidan, imunomodulator, radioprotektif, aktivitas hipoglikemik, aktivitas hipotensif, dan anti kanker (Dattani, 2008). Manfaat kemangi yang difokuskan dalam penelitian ini meliputi :

#### **1. Sebagai Antioksidan**

Kandungan aflavon sebagai antioksidan telah banyak diteliti, dimana flavonoid memiliki kemampuan untuk menangkal radikal bebas di dalam tubuh sekaligus dapat memperbaiki sel-sel tubuh yang rusak (Patil dan Jadhav, 2013).

#### **2. Sebagai Antiinflamasi**

Flavonoid adalah campuran dari dua monoterpen, geranial dan neral. Geranial memiliki aroma lemon yang kuat sedangkan neral memiliki

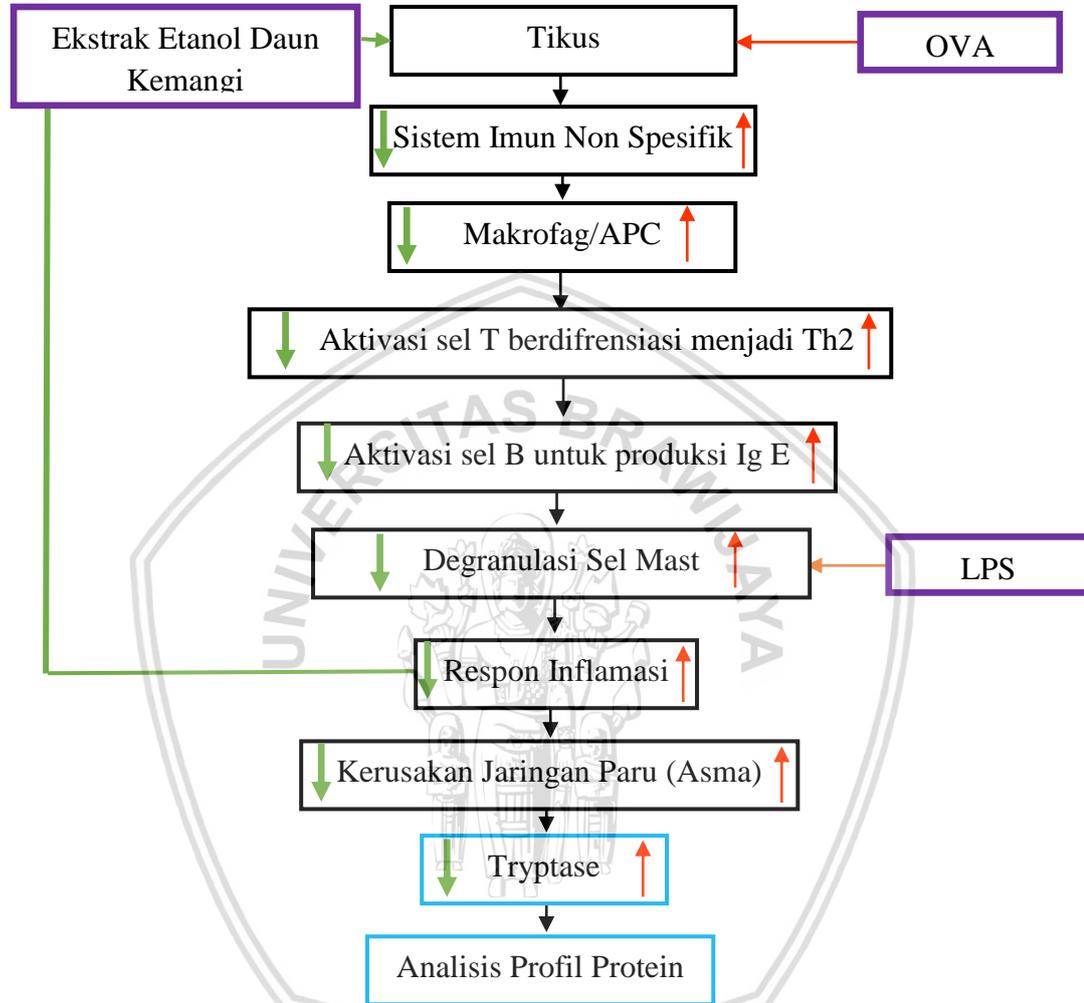
aroma lemon yang kurang kuat tetapi lebih manis (Astuti, 2012). Aktivitas flavonoid sebagai antinflamasi telah dibuktikan oleh Quinyans-Junior *et al.* (2010) flavonoid dapat menghambat pembentukan odem yang diinfeksi dengan karagenan sebesar 27,8%

### 3. Sebagai Antibakteri

Kandungan flavonoid dan fenol menjadi senyawa sebagai bahan antibakteri. Fenol pada kemangi memiliki efek yaitu merusak membran mikroba dan menstimulasi terganggunya ion-ion kalium sel yang mengakibatkan rusaknya membran sitoplasma (Yuhana *et al.*, 2013). Flavonoid bekerja dengan menghambat sintesis asam nukleat, menghambat fungsi membran sitoplasma dan menghambat metabolisme energi sel (Cushnie dan Lamb, 2005).

**BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN**

**3.1 Kerangka Konsep**



**Gambar 3.1** Kerangka konseptual

**Keterangan:**

↑ = Pengaruh induksi OVA dan LPS

↑ = Pengaruh pemberian ekstrak etanol daun kemangi

↓ = Penghambatan oleh ekstrak etanol daun kemangi

↓ = Perlakuan

□ = Variabel yang diamati

□ = Variabel bebas

Asma adalah gangguan inflamasi yang bersifat kronik pada saluran pernafasan. Ovalbumin yang berasal dari telur merupakan alergen kuat yang sering digunakan untuk menginduksi radang pada saluran pernapasan hewan coba. Induksi ovalbumin dalam penelitian ini sebanyak 3 kali, induksi pertama berfungsi sensitisasi untuk mengaktifkan *innate immunity respon* yang kemudian akan merangsang pengaktifan sel makrofag untuk melawan radikal bebas. Proses fagositosis oleh makrofag akan menghasilkan radikal bebas dengan pengaktifan ROS (*Radical Oxygen Species*) yang lebih banyak akan memicu proses inflamasi..

Induksi ovalbumin kedua diberikan sebagai aktivator dan akan menginduksi kerja sel adaptif. Ovalbumin 2 berpengaruh dengan respon imun dimulai dengan masuknya alergen kedalam seluran nafas akan ditangkap oleh sel dendrit yang merupakan sel pengenal antigen (*Antigen Presenting Cell/APC*). Antigen diproses di dalam APC dan dipresentasikan kepada sel limfosit T dengan bantuan *Major histocompatibility* (MHC) kelas II, limfosit T akan membawa ciri antigen spesifik, teraktivasi dan berdifrensiasi ke Th2. Subtipe Th2 ini merupakan subtipe utama yang terlibat pada asma, mensekresi berbagai sitokin yang bertanggung jawab bagi berkembangnya reaksi tipe lambat atau *cell-mediated hypersensitivity reaction*.

Pemberian ovalbumin ketiga secara inhalasi berfungsi sebagai efektor, secara inhalasi berfungsi sebagai efektor untuk mengaktifkan sel Th2 dengan bantuan IL-13 sebagai sitokin. Sel Th2 yang akan berdifrensiasi menjadi sel B berdifrensiasi sel plasma yang kemudian akan menghasilkan IgE yang

diinisiasi oleh IL-4. Stimulasi IgE akan berikatan dengan reseptor Fc dapat menyebabkan degranulasi sel mast dengan mediator IL-9. Aktivasi sel mast akan mengakibatkan pelepasan mediator seperti tryptase di area sekitar epitel bronkus.

Lipopolisakarida digunakan untuk menginduksi asma sebagai antigen yang akan ditangkap oleh *Lipopolysaccharide Binding Protein* (LBP). Ikatan LPS-LBP dikenali oleh *toll like receptor-4* (TLR-4) yang nantinya akan berikatan dengan sel mast. Degranulasi sel mast beserta limfosit T sub tipe Th2 akan menggerakkan dan mengaktifkan sel-sel inflamasi eosinofil

Tryptase akan mengaktifkan enzim metalloproteinase yang berada pada matrik ekstraselluler. Aktivitas enzim metalloproteinase itu pada akhirnya menyebabkan hancurnya matrik jaringan sehingga terjadi kerusakan pada jaringan. Peningkatan ekspresi tryptase dapat dipakai sebagai indikator untuk menunjukkan adanya aktivasi sel mast dan derajat keparahan klinis dari asma. Pada tikus berat molekul dari tryptase antara 110-150 kDa dengan berbentuk tetramer, sehingga dapat dilakukan analisa dan identifikasi tryptase menggunakan metode SDS-PAGE. Tryptase berperan dalam remodeling dari sel sehingga akan menginisiasi proses fibrosis pada sel dan juga dapat menyebabkan hipertrofi epitel pada kasus asma.

Pemberian ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum canum* Sims.) yang memiliki banyak kandungan meliputi anti inflamasi berupa flavonoid, dapat dijadikan alternatif sebagai terapi asma karena kandungan flavonoid dalam ekstrak etanol daun kemangi memiliki kemampuan sebagai antiinflamasi.

Flavonoid juga dapat menghambat proliferasi sel T sehingga tidak menginduksi sel B untuk menghasilkan IgE, maka tidak terjadi degranulasi sel mast dan produksi enzim tryptase. Selain itu, flavonoid dapat memblokir transkripsi NF-Kb yang diinduksi oleh bakteri *Phorphyromonas gingivali*, menghambat IL-12, dan ekspresi TNF-alfa melalui sel epitel dan sel dendritik sehingga meminimalisir sel-sel sitokin dan kemokin yang mencapai permukaan lumen melalui epitel saluran penafasan sehingga mencegah kerusakan sel epitel dan terjadinya respon inflamasi (Ikhwan dkk., 2015). Dengan demikian, kandungan dalam ekstrak etanol daun kemangi dapat menurunkan ekspresi tryptase dan merubah gambaran profil protein pada tikus (*Rattus norvegicus*) model asma yang diinduksi ovalbumin dan Lipopolisakarida.

### 3.2 Hipotesis Penelitian

Hipotesis yang dapat diajukan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Pemberian terapi ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum canum* Sims.) dapat menurunkan profil protein pada tikus (*Rattus norvegicus*) model asma yang diinduksi ovalbumin dan lipopolisakarida.
2. Pemberian terapi ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum canum* Sims.) dapat menurunkan ekspresi tryptase pada tikus (*Rattus norvegicus*) model asma yang diinduksi ovalbumin dan lipopolisakarida.

## BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

### 4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan 14 November 2017 hingga 19 Desember 2017 di Laboratorium Farmakologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Laboratorium Histopatologi Kedokteran Universitas Airlangga dan Laboratorium Biokimia Biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

### 4.2 Alat dan Bahan Penelitian

#### 4.2.1 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian kali ini adalah jas laboratorium, kandang tikus, kain handling, tempat makan dan minum tikus, sekam, spuit 1 mL, spuit 3 mL, *scalpel*, *blade*, gunting tajam-tumpul, gunting tajam-tajam, pinset chirurgis, pinset anatomis, *baker glass*, papan bedah, jarum, object glass, vortex, *Omron Compare Compressor Nebulizer*, timbangan analitik, plastik klip, aluminium foil, botol 50 mL, sonde lambung, sendok makan, lap steril, gelas erlenmeyer, dan oven, vortex, *Freezer*, *Waterbath*, mikroskop binokuler, inkubator, *elektroforesis vertikal App*, *centrifuge tube* 1,5 mL, yellow tip, blue tip

#### 4.2.2 Bahan Penelitian

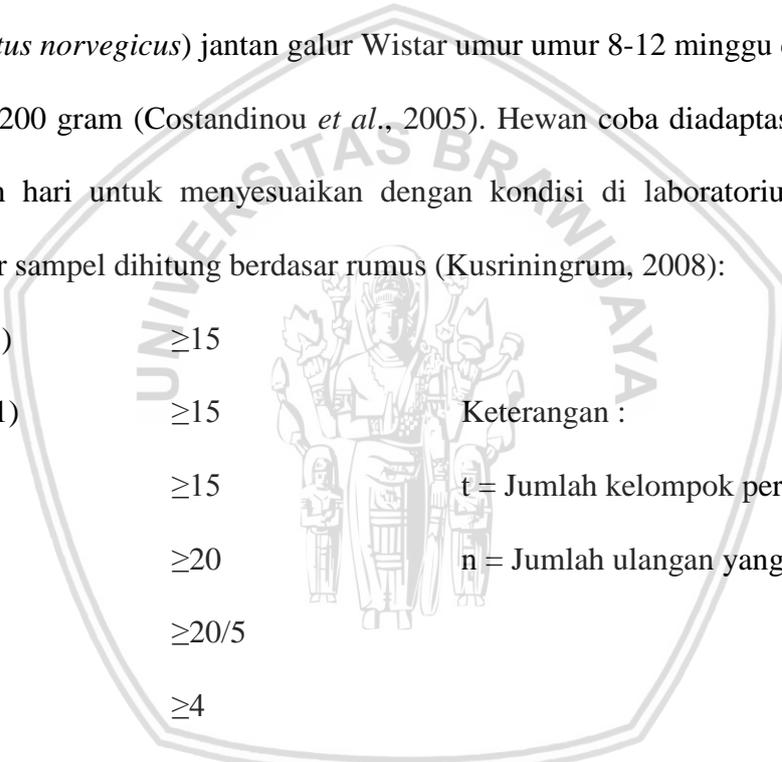
Bahan yang digunakan dalam penelitian kali ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) Strain Wistar jantan dengan berat 150-200 gram umur 8-12 minggu, Pakan standar AIN-93, LPS1435/1449 dari bakteri

*Porphyromonas gingivalis*, Ovalbumin, NaCl Fisiologis, AIOH<sub>3</sub>, PBS, aquades, tirosin, Tris-HCL (Biomedical), antibodi primer tryptase, etanol 70%, daun kemangi, dan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 4.3 Tahapan Penelitian

#### 4.3.1 Sampel Penelitian

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Wistar umur umur 8-12 minggu dengan berat 150-200 gram (Costandinou *et al.*, 2005). Hewan coba diadaptasikan selama tujuh hari untuk menyesuaikan dengan kondisi di laboratorium. Estimasi besar sampel dihitung berdasar rumus (Kusriningrum, 2008):

$t(n-1)$	$\geq 15$	 <p>Keterangan :</p> <p>t = Jumlah kelompok perlakuan</p> <p>n = Jumlah ulangan yang diperlukan</p>
$5(n-1)$	$\geq 15$	
$5n-5$	$\geq 15$	
$5n$	$\geq 20$	
n	$\geq 20/5$	
n	$\geq 4$	

Berdasarkan perhitungan diatas, untuk 5 macam kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan minimal 4 kali dalam setiap kelompok jadi total hewan coba yang dibutuhkan adalah 20 ekor.

#### 4.3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan post-test control design only. Rancangan penelitian ditunjukkan **Tabel 4.1**.

**Tabel 4.1** Rancangan penelitian dengan 5 kelompok perlakuan:

<b>Kelompok</b>	<b>Keterangan Perlakuan</b>
Kelompok A (Kontrol negatif)	Tikus tidak diberikan ekstraksi etanol daun kemangi ( <i>Ocimum canum</i> Sims.) dan tidak diinduksi ovalbumin dan lipopolisakarida.
Kelompok B (Kontrol positif)	Tikus diinduksi ovalbumin dan lipopolisakarida
Kelompok C (Terapi 1)	Tikus diinduksi ovalbumin dan lipopolisakarida dan diberikan terapi ekstrak etanol daun kemangi ( <i>Ocimum canum</i> Sims.) sebanyak 600mg/kg BB dengan volume 1 mL per oral selama 14 hari.
Kelompok D (Terapi 2)	Tikus diinduksi ovalbumin dan lipopolisakarida dan diberikan terapi ekstrak etanol daun kemangi ( <i>Ocimum canum</i> Sims.) sebanyak 900mg/kg BB dengan volume 1 mL per oral selama 14 hari.
Kelompok E (Terapi 3)	Tikus diinduksi ovalbumin dan lipopolisakarida dan diberikan terapi ekstrak etanol daun kemangi ( <i>Ocimum canum</i> Sims.) sebanyak 1200mg/kg BB dengan volume 1 mL per oral selama 14 hari.

### 4.3.3 Variabel Penelitian

Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah:

- a. Variabel bebas : Dosis pemberian ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum canum* Sims.) dan dosis induksi ovalbumin.
- b. Variabel tergantung : Ekspresi tryptase dan gambaran profil protein
- c. Variabel kendali : Tikus, jenis kelamin, berat badan, umur, pakan dan kondisi pemeliharaan.

## 4.4 Prosedur Kerja

### 4.4.1 Persiapan Hewan Coba

Hewan coba pada semua kelompok perlakuan dikandangkan secara terpisah dan diadaptasikan selama lebih kurang 7 hari. Selama penelitian tikus diberikan pakan standar AIN-93 dengan komposisi pada **Lampiran 1** dan minum secara ad libitum. Tikus dikandangkan pada kandang yang berukuran 17,5x 23,75x 17,5 cm, dengan jumlah 4 ekor. Kandang terbuat dari plastik. Kandang berlokasi dari suara yang ribut dan bebas dari asap serta polutan. Alas kandang mudah dibersihkan.

### 4.4.2 Perlakuan Hewan Model Asma

Induksi OVA dan LPS dapat memicu respon imun. Pemberian ovalbumin dilakukan tiga kali. OVA I diinjeksikan secara intraperitoneal pada hari ke 0 dihitung setelah dilakukan aklimatisasi hewan coba, OVA II

diinjeksikan secara intraperitoneal lagi pada hari ke 14 dan OVA III diberikan secara inhalasi menggunakan tabung transparan yang dihubungkan dengan *Omron Compare Compressor Nebulizer* pada hari ke 21. Injeksi LPS secara *intrasulkuler* pada *sulkus gingiva molar* rahang atas kiri tikus selama 2 hari pada hari ke 10 dan 11 (Utomo,2012).

#### 4.4.3 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Kemangi

Prosedur pembuatan ekstrak etanol daun kemangi dilakukan dengan tiga prosedur, yaitu pengeringan, ekstraksi, dan evaporasi. Proses pengeringan, kemangi dicuci sampai bersih (sampel basah), kemudian dipanggang dalam oven dengan suhu 80°C atau dengan panas matahari sampai kering (bebas kandungan air). Pada proses ekstraksi, kemangi dihaluskan dengan blender hingga menyerupai bubuk lalu ditimbang dengan timbangan analitik sebanyak 100 gram (sampel kering) kemudian dimasukkan ke dalam gelas ekstraksi/labu erlenmeyer ukuran 1 L dan direndam dalam etanol 70%, setelah itu di kocok sampai benar-benar tercampur ( $\pm$  30 menit). Wadah maserasi ditutup dan diinapkan selama 24 jam di tempat yang terlindung dari sinar matahari langsung sampai mengendap. Hal ini dilakukan 3x 24jam. Selanjutnya disaring, dipisahkan antar ampas dan filtrate. Ampas diekstraksi kembali dengan etanol 70% yang baru dengan jumlah yang sama. Hal ini dilakukan selama 3x24 jam. Filtrate yang telah di dapat kemudian dimasukkan dalam labu evaporasi 1L yang selanjutnya labu evaporasi dipasang pada evaporator dan diisi water bath dengan air sampai penuh. Semua rangkaian alat dipasang, termasuk *rotary evaporator*, pemanas *water*

*bath* (diatur sampai 90°C), disambungkan dengan alat listrik, selanjutnya dibiarkan sampai larutan etanol memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu ( $\pm 1,5$ –2 jam untuk 1 labu) sehingga didapatkan ekstrak kental. Hasil sebelum penggunaan perlu dibiarkan terlebih dahulu agar suhu sama dengan suhu ruangan (Dera, 2014)

#### **4.4.4 Pemberian Terapi Ekstrak Etanol Daun Kemangi (*Ocimum canum* Sims.)**

Pemberian terapi dimulai pada hari ke-22. Terapi daun kemangi diberikan pada kelompok terapi 1, terapi 2 dan terapi 3. Pemberian terapi dilakukan secara peroral melalui sonde lambung dengan dosis ekstrak etanol daun kemangi yang berbeda pada ketiga kelompok tersebut yaitu 600 mg/kg BB, 900 mg/kg BB, dan 1200 mg/kg BB. Pemberian terapi dilakukan satu kali per hari selama 14 hari.

#### **4.4.5 Koleksi Organ Paru-Paru (Bronkus)**

Euthanasi tikus dilakukan dengan cara diberikan anestesi dengan ketamin HCL 1 % sebanyak 0,16 ml per tikus secara intramuskular, kemudian dilakukan pembedahan. Tikus diposisikan pada posisi rebah dorsal kemudian dilakukan nekropsi. Dibuat insisi pada ventral midline abdomen, kemudian insisi kulit dan subkutan ke arah kranial lalu insisi musculus daerah abdomen ke arah kranial. Prosesus xiphoideus diangkat kemudian dipotong beserta sternum hingga cavum thoraks terbuka. Organ paru-paru diisolasi dari cavum thorax kemudian dicuci dengan NaCl-fisiologis 0,9% dingin yang berfungsi untuk membersihkan dari berbagai kotoran yang ikut pada saat

pembedahan. Kemudian paru-paru dimasukkan dalam larutan *Phosphate Buffer Saline*-azida (PBS-azida) pH 7,4 dan larutan PFA pada pot setelah itu diberi label. Organ paru pada larutan PBS digunakan untuk isolasi protein yang kemudian digunakan pada analisa profil protein, sedangkan pada larutan PFA digunakan untuk pembuatan preparat *Tryptase*.

#### 4.4.6 Pembuatan Preparat Histopatologi

Pembuatan preparat histopatologi bronkus terdiri dari beberapa proses menurut Ashari (2013) yaitu;

##### a. Fiksasi

Jaringan bronkus dimasukkan dalam larutan formalin 10% selama 18-24 jam. Setelah proses fiksasi, jaringan dimasukkan kedalam larutan aquades selama 1 jam yang berfungsi menghilangkan larutan fiksasi. Proses ini berfungsi sebagai pengawetan jaringan dan mempertahankan sel atau jaringan agar tidak mengalami perubahan bentuk ataupun ukuran.

##### b. Dehidrasi

Jaringan dimasukkan kedalam alkohol dengan konsentrasi bertingkat (70%, 80%, 90%, 95%) dengan menggunakan alat dehydrator autotechnicon selama 2 jam. Dehidrasi merupakan proses penarikan molekul air dari dalam jaringan dengan tujuan agar seluruh ruang antar sel dalam jaringan dapat diisi molekul parafin.

##### c. Clearing

Jaringan dimasukkan kedalam larutan alkohol-xylol selama 1 jam, kemudian larutan xylol murni selama 4 jam. Proses ini berfungsi menarik

alkohol atau dehidran yang lain dari dalam jaringan agar dapat digantikan dengan molekul parafin. *Clearing* merupakan proses mentransparankan jaringan.

d. Impregnasi

Potongan jaringan dimasukkan kedalam parafin cair yang ditempatkan dalam inkubator bersuhu 58-60°C selama 2-3 jam. Proses ini merupakan pengeluaran xylol dari dalam jaringan yang akan digantikan parafin cair.

e. *Embedding*

Proses ini merupakan penanaman jaringan ke media parafin yang berfungsi untuk mempermudah melakukan proses pengirisan sampel. Potongan jaringan dalam parafin yang telah memadat kemudian dilakukan pemotongan dengan ketebalan 4 mikron dan ditempelkan pada object glass. Setelah itu dipanaskan dalam inkubator dengan suhu 60 °C hingga parafin mencair.

#### 4.4.7 Pengukuran Ekspresi Tryptase Metode Immunohistokimia

Tahapan pewarnaan imunohistokimia diawali dengan perendaman slide preparat pada xylol I, xylol II, dan alkohol bertingkat (70%,80%,90%). Slide preparat kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 1x15 menit selanjutnya ditetesi dengan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> selama 20 menit. Setelah itu dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali dan dibloking dengan 5% FBS (*Fetal Bovine Serum*) selama 1 jam. Kemudian, slide preparat dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali dan selanjutnya diinkubasi dengan antibodi primer *anti- mouse tryptase* semalam pada suhu

4<sup>0</sup>C. Setelah inkubasi dengan antibodi primer dicuci dengan PBS Ph 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali. Selanjutnya ditambahkan dengan antibodi sekunder *Rabbit anti-mouse* IgG berlabel biotin dan diinkubasi selama 1 jam dengan suhu ruang.

Slide preparat ditetesi dengan *Strep Avidin Horse Radish peroxidase* (SA-HRP) selama 40 menit. Kemudian dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali. Ditetesi dengan *Diamanobenzidine* (DAB) selama 10 menit. Dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali. Selanjutnya *counterstaining* menggunakan *Mayer Hematoxylen* selama 10 menit. Dicuci dengan air mengalir. Dibilas dengan aquades dan dikeringkan, lalu slide dimounting dengan entellan dan ditutup dengan cover glass.

Pengamatan ekspresi tryptase dilakukan dengan mikroskop perbesaran 100x dengan 20 bidang pandang pengamatan. Setelah itu dihitung jumlah inti sel yang berwarna coklat secara manual dan data diolah menggunakan *Microsoft Office Excel*.

#### **4.4.8 Pengamatan Pita Profil Profil**

##### **a. Isolasi Protein**

Isolasi protein merupakan pemisahan protein dari makromolekul yang lain. Langkah pertama pengisolasian protein dari jaringan hewan adalah homogenasi Homogenasi dilakukan dengan cara menggerus jaringan sebesar menggunakan mortar steril dingin. Homogenasi dilakukan dengan penambahan pasir kuarsa, PBS *Tween* dan larutan PMSF (*Poly Methyl Sulfonil Fluoride*).

Homogenat yang didapatkan masih berupa larutan keruh. Selanjutnya disonikasi untuk menghancurkan sel sel yang belum hancur karena penggerusan, disentrifugasi debris dan organel sel akan mengendap didasar tabung sentrifus sedangkan protein yang ukurannya jauh lebih kecil terlarut dalam *buffer* sebagai supernatan yang berwarna bening. Supernatan yang telah dikoleksi diambil dan dicampurkan dengan etanol absolut dingin dengan perbandingan 1:1 dan diinkubasi semalam dengan suhu 4<sup>0</sup>C karena sebagian besar protein merupakan molekul yang mudah rusak bila tidak berada pada kondisi fisiologisnya. Setelah proses inkubasi dilakukan sentrifugasi untuk membuang supernatan dan diambil peletnya dikeringkan untuk memastikan kandungan etanol dalam pelet hilang dengan indikator bau etanol hilang. Penghomogenan setelah penambahan Tris-HCl pH 6,8 dingin.

#### **b. Persiapan Separating dan Stacking Gel**

Menurut Widyarti (2011), pembuatan separating gel 12,5% dilakukan dengan cara memasukkan 3,125 mL stok akrilamidan dan 2,75 mL 1 M Tris pH 8,8 ke dalam tabung polipropilen 50 mL, kemudian tabung ditutup, lalu digoyang secara perlahan. Selanjutnya, dimasukkan aquabides 1,505 mL ke dalam tabung, tabung ditutup, lalu digoyang secara perlahan. Kemudian, masukkan 75  $\mu$ L SDS 10% ke dalam tabung, tabung ditutup, lalu digoyang secara perlahan. Selanjutnya, dimasukkan 75%  $\mu$ L APS 10% ke dalam tabung, tabung ditutup, lalu digoyang secara perlahan. Setelah itu, dimasukkan 6,25  $\mu$ L TAMED ke dalam tabung, tabung ditutup, lalu

digoyang secara perlahan. Segera tuang larutan ke dalam plate pembentuk gel menggunakan mikropipet 1mL (jaga jangan sampai terbentuk gelembung udara) sampai batas yang terdapat pada plate; secara perlahan, tambahkan aquades di atas larutan gel dalam plate agar permukaan gel tidak bergelombang. Biarkan gel memadat selama kurang lebih 30 menit (ditandai dengan terbentuknya garis transparan di antara batas air dan gel yang terbentuk). Setelah itu, buang air yang menutup separating gel. Sesudah separating gel memadat, siapkan stacking gel 3% dengan cara yang sama seperti pembuatan separating gel dengan volume larutan Bis-akliramida 30% 0,45 mL; 1 M Tris pH 6,8 0,38mL; Aquabides 2,11 mL; SDS 10% 30  $\mu$ L; TEMED 5  $\mu$ L; APS 10% 30  $\mu$ L

### c. Injeksi Sampel dan *Running*

Masukkan plate yang sudah berisi gel ke dalam chamber elektroforesis. Tuang running buffer sampai bagian atas dan bawah gel terendam. Bila terbentuk gelembung udara pada dasar gel atau di antara sumur sampel, maka gelembung tersebut harus dihilangkan. Masukkan sampel sebanyak 10-20  $\mu$ L (yang kandungan proteinnya minimal 0,1 g dan maksimal 20-40 g) secara hati-hati ke dalam dasar sumur gel menggunakan *syringe Hemilton*. Bilas *syringe* sampai 3x dengan air atau dengan *running buffer* sebelum dipakai untuk memasukkan sampel yang berbeda pada sumur gel berikutnya (Widyarti, 2011). Untuk memulai running sampel, hubungkan perangkat elektroforesis dengan sumber listrik. Lakukan running pada arus konstan 20 mA selama kurang lebih 40-50 menit atau sampai

*tracking dye* mencapai jarak 0,5 cm dari dasar gel. Setelah selesai, tuang *running buffer* dan ambil gel dari plate (Widyarti, 2011).

#### d. Pewarnaan

Untuk tahap ini diperlukan larutan staining untuk mewarnai protein pada gel dan larutan destaining untuk menghilangkan warna pada gel dan memperjelas pita protein yang terbentuk. Larutan staining satu liter terdiri dari *Coomassie Blue R-250* 1,0 g; *Metanol* 450 mL; *Aquades* 450 mL; Asam asetat glacial 100 mL; sedangkan larutan *destaining* satu liter terdiri dari *Metanol* 100 mL dan Asam asetat glacial 100 mL.

Rendam gel dalam 20 mL *staining solution* sambil digoyang selama kurang lebih 15 menit. Setelah itu, tuang kembali larutan *staining* pada wadahnya. Selanjutnya, cuci dengan air beberapa kali dan kemudian gel direndam dalam 50 mL *destaining solution* sambil digoyang selama kurang lebih 30 menit atau sampai pita protein terlihat jelas (Widyarti, 2011).

#### e. Penentuan Berat Molekul

Berat molekul hasil SDS-PAGE dibandingkan dengan marker protein sehingga dapat diketahui jenis-jenis protein dalam sample. Penentuan berat molekul dilakukan dengan menghitung nilai *Rf* (*Retardation factor*) dari masing-masing pita. Adapun rumus *Rf* yaitu:

$$Rf = \frac{\text{Jarak pergerakan protein dari tempat awal (cm)}}{\text{Jarak pergerakan warna dari tempat awal (cm)}}$$

Kemudian dibuat kurva standar dengan harga *Rf* sebagai sumbu X dan harga logaritma berat molekul sebagai sumbu Y, sehingga diperoleh

persamaan regresi  $y = ax + b$ . persamaan ini digunakan untuk menghitung massa molekul relative dari protein sampel. Berat molekul protein sampel didapatkan dengan menggunakan rumus  $BM = \text{antilog } Mr \text{ protein sampel}$  (Fatchiyah, dkk., 2002).

#### 4.5 Analisa Data

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini yaitu menggunakan analisa statistik kuantitatif untuk data persentase rata-rata ekspresi tryptase. Sedangkan data gambaran profil protein dianalisa secara deskriptif kualitatif. Data ekspresi tryptase ditabulasi menggunakan *Microsoft Office Excel* kemudian dianalisa menggunakan *analysis of variance* (ANOVA) dengan software SPSS 16 for Windows. Analisa *one-way* ANOVA didahului dengan uji distribusi data, selanjutnya dilakukan uji homogenitas untuk mengetahui data tersebut memiliki varian yang sama atau tidak. Apabila data terdistribusi normal dan homogen maka dilanjutkan dengan uji *one-way* ANOVA untuk mengetahui perbedaan rata-rata antar kelompok perlakuan atau perbedaan secara keseluruhan atau kelompok perlakuan. Apabila hasil uji *one-way* ANOVA menunjukkan hasil yang signifikan ( $p < 0,05$ ), maka dapat dilakukan uji lanjutan menggunakan uji Tukey (Beda Nyata Jujur) dengan  $\alpha$  5% (Kusriningrum, 2008).

## BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1 Pengaruh Terapi Ekstrak Daun Kemangi (*Ocimum canum* Sims). terhadap Profil Protein Organ Paru-Paru Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Asma

Karakteristik subjek penelitian model asma dilakukan dengan mengamati gejala yang tampak diantaranya yaitu pada hari ke-21, hewan coba yang secara terus-menerus menggaruk hidung setelah pemberian Ovalbumin. Terdengar suara mengi (*wheezing*) disertai dengan frekuensi nafas yang meningkat serta adanya gejala menggaruk hidung, Gejala asma pada tikus mirip dengan gejala asma pada manusia yang ditandai dengan batuk, bersin, dan hipersalivasi (Pernans, 2010).

Hasil analisis SDS-PAGE dilakukan untuk mengkarakteristik profil protein dari organ paru. Dari electrogram yang divisulaisasi menggunakan *brom phenol blue*, diperoleh profil pita protein seperti pada **Gambar 5.1**.



**Gambar 5.1** Profil pita protein organ brokus tikus putih (*Rattus norvegicus*) model asma.

**Keterangan :** M = marker; K- = Tikus normal; K+ = Tikus Asma; T1 = tikus asma dengan terapi dosis 600 mg/Kg BB; T2 = tikus asma dengan terapi dosis 900 mg/Kg BB; T3 = tikus asma dengan terapi dosis 1200 mg/Kg BB.

**Tabel 5.1** Perbedaan Berat molekul Profil Pita Protein Organ bronkus tikus (*Rattus norvegicus*) model asma diberikan terapi ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum canum* Sims.)

Kelompok Perlakuan	Berat Molekul (kDa)					
	189	139	117	82	60	24
Kontrol Negatif	√	-	-	√	√	√
Kontrol positif	√	√	-	√	√	√
T1 600 mg/KgBB	√	√	√	√	√	√
T2 900 mg/KgBB	√	√	-	√	√	√
T3 1200 mg/KgBB	√	-	-	-	√	√

: tanda (-) menunjukkan pita protein dengan berat molekul (BM) tersebut tidak terekspresikan

Gambar 5.1 dan Tabel 5.1 menunjukkan hasil profil pita protein pada setiap perlakuan didapatkan ekspresi protein dengan berat molekul 24 kDa, 60 kDa, 82 kDa, 117 kDa, 139 kDa, 189 kDa. Pada kelompok kontrol negatif tidak terekpresikan berat molekul 139 kDa dan 117 kDa. Pada kelompok kontrol positif didapatkan ekspresi profil protein dengan berat molekul 24 kDa, 60 kDa, 82 kDa, 139 kDa, 189 kDa. Pada kelompok T1 hewan model asma yang diterapi dengan ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum canum* Sims.) dosis 600 mg/kg BB terekpresikan protein dengan berat molekul 24 kDa, 60 kDa, 82 kDa, 117 kDa, 139 kDa, 189 kDa. Pada kelompok kelompok T2 hewan model asma yang diterapi dengan ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum canum* Sims.) dosis 900 mg/kg BB didapatkan tidak terekpresikan berat molekul 117 kDa. Pada kelompok kelompok T3 hewan model asma yang diterapi dengan ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum canum* Sims.) dosis 1200 mg/kg BB didapatkan tidak terekpresikan berat molekul 139 kDa, 117 kDa, 82kDa.

Protein dengan berat molekul 139 kDa diduga merupakan protein tryptase. Menurut Bachelet (2005) Pada manusia, tikus dan anjing berat molekul dari tryptase antara 110-150 kDa dengan berbentuk tetramer, sedangkan pada jaringan sapi dan marmut persubunit yang berbentuk *multimeric complex* dengan berat molekul berturut-turut 360 kDa dan 860 kDa. Tryptase adalah merupakan protein yang terkonsentrasi selektif pada granules sekretori dari sel mast. Presentase triptase sekitar 25 % dari berat sel mast, terdapat dalam bentuk aktif melalui ikatan yang kuat dengan heparin.

Identifikasi sel mast di dalam jaringan dapat dilakukan dengan cara melokalisir enzim triptase secara imunologi. Tryptase terdiri dari alfa-tryptase yang muncul pada sekresi konstitutif dan *beta-tryptase* tersimpan dalam granule sekretori sel mast, pelepasannya lebih spesifik untuk aktifasi dari pada *alfa-tryptase* (Vitte, 2015).

Kelompok kontrol tidak memiliki pita protein dengan berat molekul 139kDa, sedangkan pada kontrol positif ditemukan pita protein dengan berat molekul 139kDa, yang mengindikasikan pita protein pada kontrol positif terekspresi tryptase. Tryptase yang diekspresikan diakibatkan oleh pemaparan ovalbumin sebagai alergen secara intraperitoneal dan inhalasi serta LPS secara intrasulkuler yang menyebabkan degranulasi sel mast dan pelepasan tryptase. Pemberian alergen secara intraperitoneal dan inhalasi dengan tujuan agar Ovalbumin segera dikenali oleh *Antigen Presenting cell* (APC) yang banyak ditemukan pada cairan intra peritoneal dan pada paru (Bratawidjaja, 2010). Lipopolisakarida yang diinjeksikan secara intrasulkuler untuk menciptakan kondisi ginggivitis sehingga mampu memperparah keadaan asma (Utomo, 2012). Ovalbumin sebagai antigen diproses di dalam APC dan dipresentasikan kepada sel limfosit T dengan bantuan *Major histocompatibility* (MHC) kelas II, limfosit T akan membawa ciri antigen spesifik, teraktivasi dan berdiffrensiasi ke Th2. Subtipe Th2 ini merupakan subtipe utama yang terlibat pada asma, mensekresi berbagai sitokin yang bertanggung jawab bagi berkembangnya reaksi tipe lambat atau cell-mediated hypersensitivity reaction (Derveau *et al*, 2004).

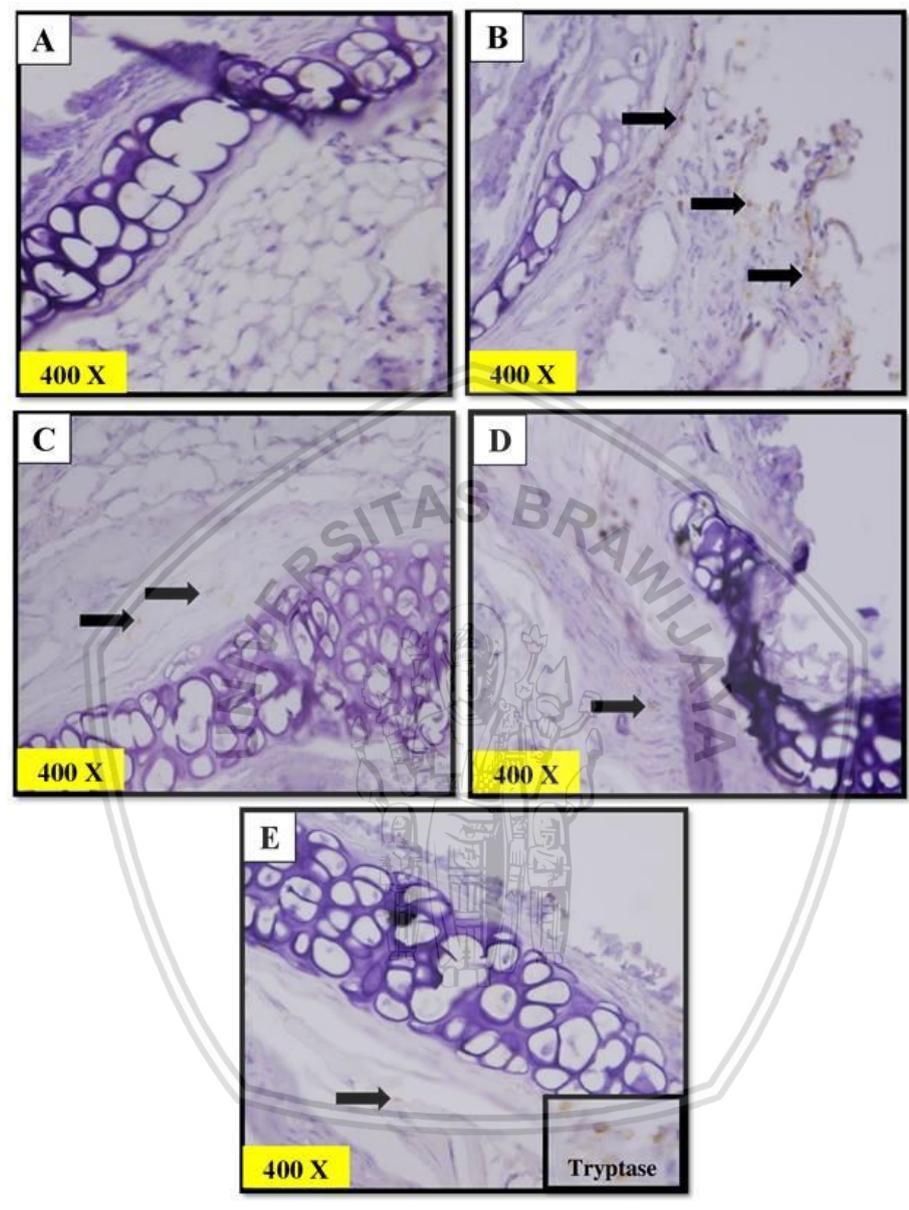
Lipopolisakarida digunakan untuk menginduksi asma sebagai antigen yang akan ditangkap oleh *Lipopolysaccharide Binding Protein* (LBP), Ikatan LPS dan TLR-4 mengaktivasi sel dendrit dan sel Th2. Sel dendrit yang aktif merangsang sel Th2 untuk memproduksi sitokin. Sitokin IL-4 dan TNF- $\alpha$  yang terlepas akan berikatan pada sel Th2 untuk menginisiasi aktivasi sel B untuk memproduksi Ig-E (Utomo., 2012). Menurut Rifa'i (2011), IgE yang berada di sirkulasi darah akan mengaktifkan sel mast. Imunoglobulin E (Ig-E) kemudian akan berikatan pada sel mast melalui receptor Fc $\epsilon$ R1 yang terletak pada sel mast. Sel mast menghasilkan mediator yang disimpan dalam granul yang dikenal sebagai *pre-formed mediator* meliputi salah satunya adalah Tryptase (Vitte, 2015). Hal yang menyebabkan tryptase muncul dalam pita protein pada kontrol positif.

Berat molekul 139 kDa terekspresi pada pita protein kelompok terapi hewan model asma yang diterapi dengan ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum canum* Sims.) dosis 600 mg/kg BB dan 900 mg/kg BB, hal ini sama halnya yang terjadi dengan kelompok kontrol positif. Pada kelompok terapi hewan model asma yang diterapi dengan ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum canum* Sims.) dosis 1200 mg/kg BB pada pita protein tidak terekspresi, hal ini disebabkan kandungan ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum canum* Sims.) pada dosis tersebut efektif digunakan sebagai terapi.

## 5.2 Pemberian Ekstrak Kemangi (*Ocimum canum* Sims). terhadap Ekspresi Tryptase pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Asma

Tryptase merupakan mediator yang dihasilkan oleh sel mast yang dikenal sebagai pre-formed mediator (Vitte, 2015). Tryptase memiliki peran penting dalam peradangan dan berfungsi sebagai penanda aktivasi sel mast (Vitte, 2015). Peningkatan ekspresi tryptase dapat dipakai sebagai indikator untuk menunjukkan adanya aktivasi sel mast dan derajat keparahan klinis dari asma (Lee, 2007). Ekspresi Tryptase ditunjukkan dengan adanya ekspresi warna kecoklatan pada bagian sitoplasma pada pewarnaan imunohistokimia (**Gambar5.2**).





**Gambar 5.2** Ekspresi Tryptase pada organ bronkus dengan metode imunohistokimia (400x)

Keterangan : ➡ : Ekspresi Tryptase

- (A) Kontrol Negatif; (B) Kontrol Positif; (C) Kelompok Terapi 1 (Dosis 600 mg/kgBB); (D) Kelompok Terapi 2 (Dosis 900 mg/kgBB); (E) Kelompok Terapi 3 (Dosis 1200 mg/kgBB).



**Tabel 5.2** Ekspresi tryptase pada tikus (*Rattus norvegicus*) model asma yang diinduksi ovalbumin dan lipopolisakarida yang diberikan terapi ekstrak kemangi (*Ocimum canum* Sims).

Perlakuan	Ekspresi tryptase (%) (mean $\pm$ SD)	Peningkatan terhadap K (-) (%)	Penurunan terhadap K (+) (%)
Kontrol Negatif	16,75 $\pm$ 3,594 <sup>a</sup>	-	-
Kontrol Positif	72,25 $\pm$ 9,323 <sup>d</sup>	76,82	-
Kelompok Terapi 1 (Dosis 600 mg/kgBB)	47,00 $\pm$ 6,928 <sup>c</sup>	-	34,95
Kelompok Terapi 2 (Dosis 900mg/kgBB)	33,75 $\pm$ 3,304 <sup>b</sup>	-	53,29
Kelompok Terapi 3 (Dosis 1200mg/kgBB)	23,00 $\pm$ 2,944 <sup>ab</sup>	-	68,17

Keterangan : Perbedaan notasi a,b,c dan d menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ) antara kelompok perlakuan.

Hasil ANOVA tryptase pada hewan coba menunjukkan adanya perbedaan yang sangat nyata ( $p < 0,01$ ). Data pada **Tabel 5.1** menunjukkan bahwa ekspresi tryptase meningkat pada kelompok kontrol positif jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif dan kelompok terapi.

Pada **Tabel 5.2**, kontrol negatif menunjukkan rata-rata ekspresi tryptase sebesar 16,75  $\pm$  3,594, nilai rata-rata produksi tryptase pada kontrol negatif digunakan sebagai standart untuk mengetahui adanya peningkatan produksi tryptase. Hal ini dikarenakan tikus kontrol negatif merupakan tikus sehat tanpa diinduksi ovalbumin dan lipopolisakarida.

Pada kelompok kontrol positif menunjukan peningkatan rata-rata ekspresi tryptase sebesar 76,82% dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif.

Berdasarkan hasil analisa statistik menggunakan Uji *Tukey*, kelompok kontrol positif menunjukkan hasil yang berbeda signifikan dengan kelompok kontrol negatif, yang ditandai dengan perbedaan notasi. Kelompok kontrol positif memiliki ekspresi tryptase paling tinggi jika dibandingkan dengan kelompok lainnya, ditandai dengan banyaknya area berwarna coklat. Pada **Tabel 5.1** kontrol positif menunjukkan ekspresi tryptase sebesar  $72,25 \pm 9,323$ , nilai rata-rata produksi tryptase pada kontrol positif digunakan sebagai standart untuk mengetahui adanya penurunan produksi tryptase pada kelompok terapi. Tingginya ekspresi tryptase karena tikus kelompok kontrol positif merupakan tikus yang diinduksi ovalbumin dan lipopolisakarida.

Paparan Ovalbumin dan LPS dapat direspon tubuh sebagai antigen sehingga meningkatkan respon inflamasi di dalam tubuh hewan coba. Ovalbumin dan LPS dapat menginduksi aktivasi makrofag, neutrofil, dan sel Th2 di dalam tubuh hewan coba (Nials *et al.*, 2008). Paparan Ovalbumin dan LPS dapat mengaktivasi sel Th2 agar memproduksi sitokin proinflamasi berupa IL-4, IL-5, dan IL-13. Hal tersebut merangsang proliferasi sel B menjadi sel plasma untuk memproduksi IgE. Ovalbumin dan LPS di dalam darah akan ditangkap oleh IgE yang berikatan dengan reseptor sel mast. Sel mast akan mengalami degranulasi dengan melepas mediator inflamasi termasuk tryptase (Endaryanto dan Harsono, 2006).

Mekanisme dari degranulasi sel mast itu pada permukaanya akan terekspos oleh suatu spesifik antigen (alergen). Kemudian alergen akan berikatan dengan IgE pada permukaan sel mast, terjadilah cross link pada IgE

antibodi dan IgE Fc *receptor*, Sehingga akan mengaktifkan suatu sinyal untuk transduction pathway yaitu berupa pengaktifan dari adenyl cyclase, yang akan berujung pada phosphorylation spesifik protein dan akan terjadi pembukaan katup  $\text{Ca}^{2+}$  pada endoplasmic reticulum,  $\text{Ca}^{2+}$  influx pada sel mast, mediator yang terdapat dalam granul akan keluar dan mulai memediasi secara lokal (Halim, 2016). Peningkatan aktivasi sel mast yang menghasilkan tryptase pada kontrol positif dapat mengindikasikan derajat keparahan klinis dari asma pada hewan coba (Lee, 2007).

Pada kelompok terapi memiliki ekspresi tryptase berbeda nyata jika dibandingkan dengan kontrol positif, ditunjukkan dengan adanya penurunan seiring dengan peningkatan dosis pemberian ekstrak etanol daun kemangi. Berdasarkan **Tabel 5.2** dapat dilihat kelompok terapi 1 dengan dosis 600 mg/kgBB menunjukkan rata-rata ekspresi tryptase sebesar  $47,00 \pm 6,928$  serta dapat menurunkan ekspresi tryptase sebesar 34,95%. Berdasarkan hasil uji Tukey menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan kontrol negatif dan kelompok kontrol positif. Kelompok terapi 2 (Dosis 90 mg/kgBB) menunjukkan rata-rata ekspresi tryptase sebesar  $33,75 \pm 3,304$  serta dapat menurunkan ekspresi tryptase sebesar 53,29%, dan berdasarkan notasi pada uji Tukey memiliki perbedaan yang signifikan dibandingkan kelompok kontrol negatif dan kelompok kontrol positif. Kelompok terapi 3 (Dosis 1200 mg/kgBB) menunjukkan rata-rata ekspresi tryptase sebesar  $23,00 \pm 2,944$  serta dapat menurunkan ekspresi tryptase sebesar 68,17%, dan berdasarkan notasi

uji *Tukey* menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan kontrol positif dan mampu mendekati notasi pada kelompok kontrol negatif.

Penurunan ekspresi tryptase pada Kelompok terapi disebabkan karena pemberian terapi ekstrak kemangi (*Ocimum canum* Sims.) memiliki kandungan flavonoid. Senyawa flavonoid adalah kelompok fenol yang tersebar luas di semua tanaman. Flavonoid merupakan salah satu golongan senyawa metabolit sekunder yang diteliti mempunyai sebagai antiinflamasi. Flavonoid sebagai anti inflamasi dapat menghambat proliferasi sel T sehingga tidak menginduksi sel B untuk menghasilkan IgE yang menyebabkan tidak terjadinya degranulasi sel mast dan produksi enzim tryptase (Ikhwan dkk., 2015). Enzim tryptase yang tidak diproduksi akan menghambat aktifnya enzim metalloproteinase yang berada pada matrik ekstraselluler. Aktivitas enzim metalloproteinase dapat menyebabkan hancurnya matrik jaringan sehingga terjadi kerusakan pada jaringan (Rifa', 2004). Dengan tidak aktifnya enzim metalloproteinase maka dapat mengurangi hancurnya matrik jaringan.

Kandungan flavonoid yang mampu menghilangkan inflamasi dapat meminimalisir adanya inflamasi pada organ bronkus pada kasus asma, sehingga terjadi penurunan ekspresi tryptase yang disebabkan oleh terapi ekstrak kemangi (*Ocimum canum* Sims.). Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa dosis terapi ekstrak kemangi (*Ocimum canum* Sims.) sebesar 1200 mg/kgBB merupakan dosis terbaik sebagai terapi pada tikus (*Rattus norvegicus*) model asma yang diinduksi ovalbumin dan lipopolisakarida karena mendekati kontrol negatif.



## BAB 6 PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa:

1. Pemberian ekstrak kemangi (*Ocimum canum* Sims). dapat digunakan sebagai terapi pada tikus (*Rattus norvegicus*) model asma yang diinduksi ovalbumin dan lipopolisakarida, yang ditandai dengan tidak munculnya pita protein pada berat molekul 139 kDa dan menurunkan ekspresi tryptase.
2. Dosis 1200 mg/kg BB merupakan dosis terbaik yang dapat menurunkan pita profil protein dan dapat menurunkan ekspresi tryptase mendekati kelompok kontrol negatif.

### 5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terkait kadar flavonoid dalam ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum canum* Sims) yang berasal dari kota Malang dan peningkatan dosis terapi ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum canum* Sims). agar hasil yang diperoleh didalam penelitian lebih signifikan lagi.

## DAFTAR PUSTAKA

- Armitage, D. 2004. *Rattus norvegicus*. Animal Diversity Web Online. at: //animaldiversity.ummz.umich.edu/accounts/Rattus\_norvegicus/. [06 September 2017].
- Arobi, I. 2010. Pengaruh Pemberian Jahe Merah (*Zingiber officinale rosc*) Terhadap Perubahan Pelebaran Alveolus Paru-Paru Tikus (*Rattus noevigicus*) yang terpapar alletrin [Skripsi]. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim. Malang.
- Astuti, S. 2008. Isoflavon Kedelai dan Potensinya Sebagai Penangkap Radikal Bebas. *Jurnal Teknologi Industri dan Hasil Pertanian*, 13(2) : 126-136.
- Ayu, D.Larasati. 2016. Efek Potensial Daun Kemangi (*Ocimum canum* Sims.) sebagai Pemanfaatan Hand Sanitizer. Bagian Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Lampung.
- Bachelet. M.L. 2005. Tryptase as an Inflammatory Marker in Allergic Disease and Asthma. Departement of Phamacolofy School of Pharmacy Faculty of Medicine. Jerusalem.
- Barlianto, W., S.C.K., Mohammad, K. Setyawati, dan M. Karyono. 2009. Pengembangan Model Mencit Alergi dengan Paparan Kronik Ovalbumin. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, 2(15):2-5.
- Barnes, P.J, Djukanovic, and S.T. Holgate. 2003. Pathogenesis of asthma. In: Gibson, G.J., D.M. Geddes., U. Costabel., P. Sterk., B. Corrin (eds.).
- Berlian, F. A. 2006. Jaringan penyambung. Buku Teks Histologi jilid I. Binarupa Aksara. Jakarta. 169 – 70.
- Bonagura C. Theoharides, Ph.D, M.D Peter Valent, C. Akin. 2008. Mast cell, Mastocytosis, and Related Disorders. *Journal New England*. 2008;373:163-172.
- Busse, W.W. and R.F. Lemanske. 2001. Asthma. *The New England Journal of Med* 344(5) : 350-362.
- Canonica GW. 2006. Treating Asthma As An Inflammatory Disease. *Chest*. 130: 88-218.

- Carey, S.A. 2011. *Feline Asthma: A Pathophysiologic Basic of Therapy*. Michigan State University of Veterinary Medicine. USA.
- Carol O, dan T.C Yao . 2011. The genetics of asthma and allergic disease: a 21st century perspective. *Immunological review* 242: 10-30.
- Chopra D, 2009. *Plantamor Informasi Spesies Kemangi (Ocimum sanctum L.)*. , p.1. Available at: <http://www.plantamor.com/index.php?plant=914> [Accessed Sep 20, 2017].
- Cushnie, T.P.T., A.J Lamb. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26(5), pp.343–356.
- Dattani, M., 2008. *Ocimum Sanctum And Its Therapeutic Applications*. *Pharmaceutical Reviews*, 6. Available at: <http://www.pharmainfo.net/reviews/ocimum-sanctum-and-its-therapeuticapplications>.
- David AK, J Hayward, JK Marshall, and AE Woods. 2005. The effect of insufflation condition on rat mesothelium. *International Journal Of Inflammation*. 2005;2005:3-5.
- Dera, A.M. 2014. Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Etanol Daun Kemangi (*Ocimum basillicum L.*) Terhadap Pertumbuhan salmonella typhi Secara In Vitro. Fakultas Kedokteran Universitas Tanjungpura. Pontianak.
- Fatchiyah E. L. Arumingtyas., S. Widyarti dan S. Rahayu. 2002. *Biologi Molekular Prinsip Dasar Analisis*. Erlangga. Jakarta
- Feulner, J. A. 2003. Identification of Acyloxyacyl Hydrolase, a Lipopolysaccharide-Detoxifying Enzyme, in the Murine Urinary Tract. Dissertation Doctor of Philosophy Faculty of the Graduate School of Biomedical Science The University of Texas Southwestern Medical Center at Dallas.
- Fitri, N. Ramdani. 2014. Uji Efek Daun Kemangi (*Ocimum canum Sims.*) Terhadap Penyembuhan Luka Insisi Kelinci (*Oryctolagus cuniculus*). Fakultas Kedokteran Universitas Sam Ratulangi. Manado.
- Foster, S.F, G.S. Allan, P, Martin, and I.D. Robertson. 2004. Twenty five asthma syndrom (1995-2000). *Journal of feline medical and surgery*, 6(3):181-188.

- Gunawan, G., Sulistia, S. Rianto, Nafrialdi, dan Elysabeth. 2007. *Farmakologi dan Terapi*. Jakarta : Departemen Farmakologi dan Terapeutik Universitas Indonesia.
- Hadipoentyanti, E., S. Wahyuni. 2008. Keragaman Selasih (*Ocimum Spp.*) Berdasarkan Karakter Morfologi, Produksi Mutu Herba. *Jurnal Littri*, 14(4), pp.141–148.
- Halim, MF. 2016. Pengaruh Insuflast Terhadap Jumlah Sel Mast Peritoneum Tikus. *Fakultas Kedokteran Universitas Lambung Mangkurat Banjarmasin*.
- Hernawati. 2005. *Sistem Pernafasan Manusia pada Kondisi latihan dan Perubahan Ketinggian*. Jurusan Biologi Universitas Pendidikan Indonesia. Bandung.
- Huntingeston, J.A. and S. Pedro. 2001. Structure and Properties of Ovalbumin. *Journal of Chromatography*, B756(1-2):189-198.
- Ikhwan, M. R., C. Luthfi., A. Nabil., B. Yusuf. 2015. Tanaman dengan Aktivitas Anti-Asna. *Jurnal Pharmascience*, Vol 3, No. 1, hal: 1 – 9
- Iman, E.R.S, R. Ratih, E.N. Hasutji, Suryani dan T. Wiwiek. 2011. *Buku Ajar Mikrobiologi Veteriner 1*. Pusat Penerbitan dan Percetakan Unair (UAP): Surabaya.
- Ishmael, F. T. 2011. The Inflammatory Response in the Pathogenesis of Asthma. *JAOA: Supplement 7 (The Whole Patient)*, 111(11) : S11-S17.
- Jeffery, P.K. 2004. Remodelling and Inflammation of Bronchi in Asthma and Chronic Obstrutive Pulmonary Disease. *Proc Am Thorac Soc*, 1(3) : 176 – 183.
- Joshi, B., S. Lekhak, and A. Sharma. 2009. Antibacterial Property of Different Medical Plants: *Ocimum sanctum*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Xanthoxylum armatum*, and *Origanum majorana*. *Kathmandu University J. Sci, Eng, and Tech.*, 5(1): 143-150.
- Kusriningrum. 2008. *Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Lee. T.M. 2007. *Peran Sel Mast Dalam Reaksi Hipersensitivitas Tipe-1*. Fakultas Kedokteran Universitas Trisakti. Jakarta.

- Leveno, Merijanti.2009. Peran sel mast dalam reaksi hipersensitivitas tipeI. *Jurnal Kedokteran Trisakti*. 2009;18(3):145-146.
- Madigan, M. T., J. M Martinko, and J. Parker. 2003. *Brock Biology of Microorganism Pearson Educationi. Inc. New Jersey*. Hal: 79-80.
- Mardiana, L.2012. *Daun Ajaib Tumpas Penyakit*. Jakarta: Penebar Swadaya Grup.
- Matondang, M.A., H.M, Lubis., R.M, Daulay., G, Panggabean., W, Dalimunthe. 2009. Peran Komunikasi, Informasi, dan Edukasi pada Asma Anak. Departemen Ilmu Kesehatan Anak, FK-USU/RS. H. Adam Malik. Medan. *Jurnal Sari Pediatri*. 10(5): 314-319.
- Murphy, D.M., O'Byrne, P.M. 2010, Recent advances in the pathophysiology of asthma, *Chest*, 137(6): 1417-26.
- Nelson, F.I., C.L.L.Linnemann, and N.H.Weldon. 2007.Sub Lingual Immunoteapy for Respiratory allergic. *Journal Allergy Clin Immunol*.2007.117:1021-35.
- Nials, A.T, and S, Udin. 2008. Tikus model asma alergi: akut dan kronis tantangan alergen. *Dis Model Mech*, 1:213-20.
- Nugroho P., F Sastra. 2006. Isolasi dan uji aktivitas antibakteri minyak atsiri dari rimpang lengkuas (*alpinia galanga l.*). *Jurnal kimia* 2: 100-104.
- Oktavia, S., H. Arifin dan R. Irawati. 2015. Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Kemangi (*Ocimum sanctum L.*) Terhadap pH dan Tukak Lambung Pada Tikus Putih Jantan. *Jurnal Farmasi Higea*, Vol. 7, No. 2, 2015
- Patil AB, A.S Jadhav . 2013. Flavonoids and antioxidant: a review. *International Journal of Pharmaceutical and Biological Sciences Research and Development*. 1(2):7-20.
- Quintans-Junior,L.J., G. Andriana., T Marilia., E.S Bruno. 2011. Citral reduces nociceptive and inflammatory response in rodents. *Brazilian Journal of Phamacognosy* 21 (3), 497-502.
- Rahman, Shahedur., R, Islam., M, Kamruzzaman. 2011. *Ocimum sanctum L.: A Review of Phytochemical and Pharmacological Profile*. *American Journal of Drug Discovery and Development* ISSN 2150-427x / DOI: 10. 3923/ajdd.2011
- Reed, C.E., and H, Kita. 2004. The Role Of Protease Activation Of Inflammation In Allergic Respiratory Disease. *Journal Allergy Clinical Immunology*. 114(5):997-1008.

- Reinero, C.R. 2013. Advance in teh Diagnosis and Treatment of Feline Asthma. USA: University of Missouri Columbia. Western Veterinary Conference 2013.
- Rengganis I. 2008. Diagnosis dan Tatalaksana Asma Bronkial. Departemen Ilmu Penyakit Dalam, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Majalah Kedokteran Indonesia, Vol. 58, No.11: 445-446.
- Riansyah, Y., L Mulqie., C Ratu. 2015. Uji Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak Etanol Daun Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea Batatas* (L.) Lamk) Terhadap Tikus Wistar Jantan. Prosiding Penelitian SPeSIA Unisba ISSN 2460-6472
- Ridwan, Endi. 2013. Etika Pemanfaatan Hewan Percobaan dalam Penelitian. J Indon Med Assoc. 2013; 63:112-116
- Rifa'i, M. 2004. Alergy and Hipersensitif. Diktat Konsep Alergi dan Hipersensitif. Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya.
- Sari, C.Y.I. 2013. Inflamasi Alergi pada Asma. Jurnal Imunologi (40) : 8. Fakultas Kedokteran. Jakarta : Universitas Indonesia.
- Sarma, D. S. K and A.V.S Babu. 2011. Antioxidant and Antimicrobial Activity of *Ocimum americanum*. PHARMANEST - An International Journal of Advances In Pharmaceutical Sciences Vol.2 (2 - 3). ISSN 0976 - 3090, 2231- 0541 (Online).
- Savira, I. 2012. Pengaruh Ekstrak Daun Kemangi (*Ocimum sanctum*) Terhadap Penurunan Kadar SGPT Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi Parasetamol. Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret. Surakarta.
- Sharma, A, S. Bansal, and R.K. Nagpal. 2011. Lipid Peroxidation in Bronchial Asthma. Indian Journal of Pediatrics 70(9) : 715717.
- Smits, J. 2009. *Oral Health and the Connection to Respiratory Disease*, 482 *Oral Disease: Prevention and Management*. University of Michigan Dental Hygiene E-Learning Program. Michigan.
- Spertini F., C Reymond., A Leimgruber. 2009. Allergen-Specific Immunotherapy of Allergy and Asthma. Expert Review of Respiratory Medicine. New York.
- Suckow, M.A., H. Steven, C. L. Franglin. 2006. The Laboratory Rat Second Edtion. A volume in American Coolege of Laboratory Animal Medicine. Academic Press.

- Sundaru, H. 2002. Respons Imun Pada Asma Bronkial. Dalam: Naskah Lengkap Pit Ipd. Alwi F, Setiati S, Kasjmir YI, Bawazier LA, Syam AF, Mansjoer A, Suprahoita, eds. Jakarta: Pusat Informasi dan Penerbitan Bagian IPD FKUI. p. 1-6.
- Tallamma, F. 2014. Efektivitas Ekstrak Daun Kemangi (*Ocimum Basilicum L.*) Terhadap Penurunan Kadar Volatile Sulfur Compounds (VSCs). Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hasanuddin. Makasar.
- Tang, M.L. K, J.W. Wilson, and A.G. Stewert. 2006. Airway Remodeling in Asthma: Current Understanding and Implication For Future therapies. *Pharmacology & Therapeutic*, 112:474488.
- Utomo, H. 2012. Rapid Relief Mechanism of Allergic Rhinositis after” Assited Drainage” Therapy. Dental Hospital, Faculty of Dentistry, Airlangga University, Surabaya. *Journal of Dentistry Indonesia* 2012,19(3): 57-64.
- Vitte J. 2015. Human mast cell tryptase in biology and medicine. Vol. 63, 18-24
- Verstraelen S,K Bloemen ,H Witters ,G Schoeters,RV Heuvel. 2008. Cell types involved in allergic asthma and their use in in vitro models to assess respiratory sensitization. *Toxicology in Vitro* :1419-31.
- Wadsworth, S.J., S. J, Yang., dan D.B, Dorscheid. 2012. IL-13, Asthma and Glycosylation in Airway Epithelial Repair. License InTech Carbohydrates – Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology. <http://dx.doi.org/10.5772/51970>.
- Wang X., and P.J.Quinn. 2010. Review Lypopolysacharide. Biosynthetic Pathway And Structure Modification. *Progress in Lipid Research* (49) 97-107. Elsevier Ltd.
- Widyarti, S. 2011. Biologi Molkuler-Prinsip Dasar Analisis . Jakarta: Erlangga.
- Yuhana, S.A., R Kusdarwati., K Melesf., 2013. Daya antibakteri ekstrak daun kemangi (*Ocimum sanctum L.*). [Skripsi]. Surabaya. Fakultas Perikanan dan Kelautan. Universitas Airlangga.
- Zahara, R. 2013. Uji Aktivitas Antiinflamasi Minyak Atsiri Daun Kemangi (*Ocimum americanum L.*) Pada Tikus Putih Jantan yang Diinduksi Karagenan. Fakultas Farmasi Universitas Indonesia.

